

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

SUR LES PROPRIÉTÉS ESSENTIELLES DE L'ANATOXINE DIPHTÉRIQUE

par G. RAMON.

L'anatoxine diphtérique a été surtout envisagée jusqu'ici dans ses applications pratiques. Accueillie d'abord non sans quelque scepticisme, exposée par la suite aux critiques, l'anatoxine s'est progressivement substituée à tous les vaccins antidiphtériques successivement essayés durant vingt années. Très généralement utilisée, à l'heure actuelle, dans l'immunisation active vis-à-vis de la diphtérie, sa valeur n'est plus mise en doute. Assuré de sa diffusion, nous avons pu nous livrer ces derniers temps, au laboratoire, à une étude très approfondie de ses propriétés essentielles. Ce sont les résultats de cette étude que nous apportons ici (1).

Spécificité.

On pouvait craindre que l'action du formol et de la chaleur qui fait disparaître entièrement la nocivité de la toxine diphté-

(1) En ce qui concerne nos publications antérieures sur l'anatoxine diphtérique, voir *C. R. Société Biologie*, 79, 1923, p. 2. *C. R. Académie des Sciences*, 77, 1923, p. 1338. Ces *Annales*, 38, 1924, p. 1, 42, 1928, p. 959 et 45, 1930, p. 291.

rique n'altérât les qualités antigènes de l'anatoxine résultant de cette action, il n'en est rien. Nous constaterons, en effet, au cours de ce travail, la rigoureuse spécificité de l'anatoxine.

L'anatoxine se révèle aussi spécifique dans son pouvoir floculant, dans son pouvoir saturant vis-à-vis de l'antitoxine, que la toxine elle-même. L'affinité spécifique de l'anatoxine pour l'antitoxine : est au moins aussi grande, sinon plus grande que celle de la toxine; nous en aurons la preuve lorsque nous examinerons cette propriété bien particulière à l'anatoxine : le pouvoir dissociant.

L'anatoxine provoque *in vivo* l'immunité et la production d'antitoxine spécifique; dans ce cas, l'antitoxine provient d'un antigène dépourvu de toxicité et, cependant, elle neutralise la toxine diphtérique la plus active, aussi bien que l'antitoxine issue de la toxine elle-même.

Ainsi s'affirme, dans toutes ses propriétés, la spécificité absolue de l'anatoxine.

Valeur intrinsèque et pouvoir floculant.

L'anatoxine n'est pas, comme certains l'ont pensé, ou le croient encore, une toxine simplement modifiée par le formol. Depuis les mémorables travaux de E. Roux et A. Yersin sur la toxine diphtérique, on sait atténuer, annihiler par de multiples procédés la nocivité d'un poison microbien. Longue est la liste des agents physiques, chimiques, biologiques anciennement ou récemment utilisés par de nombreux expérimentateurs plus préoccupés, en général, de la disparition de cette nocivité que de la conservation de certaines autres propriétés plus intéressantes de la toxine (1). L'anatoxine, nous l'avons dit

(1) ROUX et VAILLARD, dès 1892, emploient la liqueur de Gram pour enlever au poison tétanique sa toxicité. Behring et ses collaborateurs utilisaient le trichlorure d'iode, les sels d'or. A. Calmette (1895), l'hypochlorite de chaux (venins), etc., etc... BURCKARD (1895), GLENNY (1904), ANDERSON (1907), LÖWENSTEIN (1909) cherchent à utiliser le formol. Löwenstein, en particulier, ne peut réussir à débarrasser la toxine diphtérique de sa nocivité, au moyen du formol; aussi se sert-il, pour des essais d'immunisation active vis-à-vis de la diphtérie, des mélanges toxine-antitoxine surneutralisés (*Deutsche mediz. Woch.*, 1921, p. 833); il échoua également dans ses essais d'immunisation antitétanique chez l'homme avec sa toxine formolée qui lui avait permis de

déjà dans une de nos publications, ne représenterait qu'un progrès relatif dans la préparation des antigènes, n'apporterait aucune contribution nouvelle à la pratique de l'immunisation antitoxique si elle n'était qu'un bouillon diphtérique dont la

TABLEAU I.

LIEU D'INJECTION de la toxine d'épreuve	NUMÉROS des cobayes (1)	DOSES d'épreuve (en doses mortelles)	RÉSULTATS
Sous la peau. . .	3-6 I	100	Survit.
	1-2 I	100	Mort en trente-six heures.
	27-28 I	100	Mort en vingt-quatre heures.
	11-12 I	200	Survit.
	24-22 I	200	Survit.
	19-20 I	200	Mort en vingt-quatre heures.
	23-24 I	500	Mort en trente-six heures.
	15-16 I	500	Mort en vingt-quatre heures.
	37-38 I	500	Mort en vingt-quatre heures.
	45-46 I	1.000	Survit.
	41-42 I	1.000	Survit.
	35-36 I	1.000	Survit.
Dans les muscles.	64-65 I	100	Survit.
	54-55 I	100	Survit.
	58-59 I	100	Mort en trente-six heures.
	48-49 I	200	Mort en trente-six heures.
	50-51 I	200	Survit.
	62-63 I	200	Mort en vingt-quatre heures.
	60-61 I	500	Survit.
	43-44 I	500	Survit.
	52-53 I	500	Survit.
	56-57 I	1.000	Mort en trente-six heures.
	25-26 I	1.000	Survit.
	29-30 I	1.000	Mort en trente-six heures.

(1) Cobayes injectés le 27 novembre 1930 avec 5 cent. cubes d'anatoxine et éprouvés le 29 décembre.

toxicité a été plus ou moins abolie par l'action simultanée de l'aldéhyde formique et de la chaleur.

L'intérêt de l'anatoxine est non seulement dans son innocuité, mais surtout dans ses qualités antigènes. Elle floccule en présence de la toxine et la mesure de ce pouvoir de flocculation

conférer à des animaux d'expériences une certaine immunité. Il manquait surtout, à tous ces expérimentateurs, le moyen pratique de se rendre compte du pouvoir antigène de leurs toxines plus ou moins modifiées. Grâce à la flocculation, nous devons fournir ce moyen, en même temps que nous mettions en évidence l'anatoxine, sa valeur antigène intrinsèque, ses propriétés spéciales.

est aussi celle de son pouvoir de saturer la toxine, *in vitro*, et de déterminer, *in vivo*, l'immunité spécifique.

La mesure du pouvoir immunisant est bien plus exacte par la réaction de floculation que par l'expérience sur l'animal; nous l'avons indiqué dès le début de nos travaux sur l'anatoxine, et nous allons le confirmer par ce qui suit.

Cherchons, par exemple, à nous rendre compte chez l'animal de la valeur, au point de vue immunité, d'un échantillon donné d'anatoxine. Dans ce but, injectons sous la peau d'un certain nombre de cobayes 5 cent. cubes de cet échantillon. Un mois après, éprouvons ces animaux avec des quantités de toxine représentant des nombres variables de doses mortelles (pour un animal neuf). Nous obtiendrons des résultats semblables à ceux portés sur le tableau I et tirés d'une de nos très nombreuses expériences (1).

Que conclure de résultats aussi disparates? Nous constatons que la même quantité du même échantillon d'anatoxine produit chez certains cobayes une immunité qui leur permet de résister à l'injection de 1.000 doses mortelles et, chez d'autres, l'immunité n'est pas même suffisante pour qu'ils puissent supporter 100 doses mortelles. Et pourtant, faisons-le remarquer, il s'agit de cobayes pesant le même poids, provenant du même élevage et qui sont en parfaite santé et, par conséquent, aussi comparables que possible. En présence de ces résultats, que connaissent bien ceux qui se sont livrés à de telles expériences, il ne semble guère possible de chiffrer, au moyen de l'essai chez l'animal, la véritable valeur d'un échantillon d'anatoxine. On ne peut même pas songer à établir des « pourcentages d'immunité », car ces pourcentages, à moins d'employer un nombre considérable d'animaux, ont peu de signification.

Au lieu d'utiliser l'épreuve directe de mortalité ou de survie, on pourrait chercher à apprécier l'immunité des animaux injectés avec un échantillon d'anatoxine, soit en pratiquant chez ces animaux eux-mêmes une épreuve intradermique et en établissant un « index d'immunité » (Glenny) comparable au

(1) Durant des mois, nous avons effectué des expériences du même genre ou du genre de celles qui vont suivre sur les cobayes servant au contrôle de l'innocuité de l'anatoxine. Cette expérimentation porte à l'heure actuelle sur des milliers d'animaux.

« pourcentage d'immunité » et soumis aux mêmes inconvénients, soit en dosant l'antitoxine dans les sérums prélevés

TABLEAU II.

	POIDS des cobayes le jour de l'injection (en grammes)	POIDS des cobayes le jour de l'épreuve (en grammes)	DOSES d'épreuve (en doses mortelles)	RÉSULTATS
Echantillon n° 1 (9 unités F.) [1]	300	430	100	+
	»	460	100	—
	»	440	100	—
	»	450	100	—
	»	380	100	+
	»	460	200	—
	»	480	200	—
	»	400	200	+
	»	430	200	—
	»	390	400	+
	»	460	400	—
	»	410	400	—
Echantillon n° 2 (12,5 unités F.) [2]	»	435	400	+
	»	375	100	—
	»	400	100	+
	»	380	100	—
	»	490	200	—
	»	450	200	—
	»	430	200	—
	»	435	200	—
	»	450	200	+
	»	415	400	+
	»	410	400	—
	»	410	400	—
Echantillon n° 3 (16 unités F.) [2]	»	360	400	+
	»	450	400	—
	»	440	100	—
	»	400	100	—
	»	400	200	—
	»	470	200	—
	»	470	200	—
	»	430	200	—
	»	420	400	—
	»	450	400	—
	»	380	400	+
	»	430	400	+
	»	350	600	—
	»	430	600	—
	»	420	600	—
	»	400	600	+
	»	400	600	+

(1) Ces chiffres indiquent la valeur antigène intrinsèque en unités de floculation.

(2) Le signe + indique la mort du cobaye, le signe — la survie.

chez les animaux. Donnons un exemple de ce dernier procédé.

Un lot de cobayes reçoit sous la peau 5 cent. cubes d'anatoxine. Un mois après ces cobayes sont saignés et l'on procède

au dosage *in vivo* (ce qui demande encore d'autres animaux) [1] de chacun des sérums ainsi recueillis. Voici les résultats obtenus :

SÉRUM DU COBAYE	TITRE ANTITOXIQUE
N° 15-16 90.	4/30 d'unité.
N° 30-31 90.	$> 1/30 < 1/10$ d'unité.
N° 23-24 90.	> 1 unité < 2 unités.
N° 10-11 90.	$> 1/2$ unité < 1 unité.
N° 25-26 90.	> 1 unité.

Nous pourrions allonger cette liste, elle nous montrerait des résultats aussi variables que ceux fournis par l'épreuve directe.

Tous ces essais font ressortir, sans qu'il soit besoin d'insister, les difficultés, sinon l'impossibilité pratique, d'arriver chez l'animal d'expériences à fixer la valeur absolue, au point de vue de son action immunisante, d'un échantillon d'antitoxine. Tout au plus pourrait-on essayer de déterminer, chez l'animal, la valeur comparative de différents échantillons en utilisant un grand nombre d'animaux choisis aussi semblables que possible. Voici, par exemple, une tentative faite dans ces conditions. Elle a porté sur trois échantillons d'anatoxine injectés le même jour à la dose de 5 cent. cubes sous la peau de cobayes de même poids répartis en trois lots, correspondant à chaque échantillon. Tous ces animaux ont été éprouvés trente-deux jours après l'injection, avec des doses variables de toxine active. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau II.

Si nous consultons avec attention ce tableau dans sa colonne de droite, nous arrivons, non sans peine, à nous rendre compte que l'échantillon n° 3 a, chez le cobaye, un pouvoir immunisant sensiblement supérieur à celui du n° 2, lequel paraît légèrement plus prononcé que celui de l'échantillon n° 1. Mais nous pourrions nous éviter cette peine en lisant le titre en unités floclantes placé à gauche du tableau. Au premier coup d'œil, nous sommes fixés; nous voyons que :

	UNITÉS
l'échantillon n° 1 titre	9
l'échantillon n° 2 titre	12,5
l'échantillon n° 3 titre	16

(1) D'où de nouveaux inconvénients.

Ainsi, les résultats assez difficiles à interpréter que nous avons obtenus avec 40 cobayes, nombre de manipulations et au bout de cinq semaines, nous les avons acquis avec plus de netteté et de précision avec la réaction de floculation, au moyen de quelques tubes et en quelques heures à peine. De plus, les renseignements que nous apporte l'expérimentation chez l'animal n'ont qu'une valeur de comparaison et sont relatifs à l'espèce animale utilisée. La floculation, par contre, permet d'estimer aussi exactement que possible la valeur antigène intrinsèque absolue de chaque échantillon d'anatoxine ou, autrement dit, le pouvoir qui appartient en propre à chaque échantillon de produire l'immunité spécifique chez tel ou tel organisme vivant, capable d'acquérir cette immunité.

Nous allons montrer, à titre d'exemple, tout l'intérêt que présente pour l'immunité antidiphtérique de l'homme la détermination de la valeur antigène intrinsèque de l'anatoxine par la méthode de floculation.

En collaboration avec le Dr Nelis, du Laboratoire de l'Administration de l'Hygiène à Bruxelles (1), nous avons mis en parallèle dans l'immunisation active chez l'enfant des échantillons d'anatoxine que la réaction de floculation nous révélait très différents en valeur antigène. A deux échantillons d'anatoxine (R et R') préparés par l'un de nous et qui titraient 16 et 12,5 unités (les mêmes que les n^{os} 2 et 3 de l'expérience ci-dessus exposée), nous avons comparé deux échantillons (A et B) pris dans le commerce, en Belgique, et dont le titre était respectivement 7 et 4,5 unités.

Cette comparaison a été réalisée dans trois séries d'essais effectués au cours de la vaccination antidiphtérique pratiquée dans des colonies scolaires de l'Œuvre nationale belge de l'Enfance. Dans chacune de nos trois séries d'essais, nous avons divisé le contingent des enfants à vacciner en deux groupes aussi identiques que possible quant au nombre et à l'âge des sujets, ceci afin de rendre plus comparables les résultats. Pour des raisons d'ordre pratique et local, nous avons dû nous borner à faire seulement 2 injections d'anatoxine : une première injection de 0 c. c. 5 et une deuxième

(1) C. R. Société de Biologie, 105, 1930, p. 500.

de 1 cent. cube, effectuée vingt-deux à vingt-cinq jours après la première.

L'épreuve de Schick, faite de douze à quatorze jours après la deuxième injection d'anatoxine, a permis de se rendre compte du pourcentage des enfants immunisés par chacune des deux sortes d'anatoxine de pouvoir antigène intrinsèque différent; en voici les résultats :

	SCHICK négatif	POURCENTAGE
269 enfants vaccinés avec anatoxine A, B (7 et 4,5 unités)	216	80
293 enfants vaccinés avec anatoxine R, R' (16 et 12,5 unités)	276	94,2

Donc 80 p. 100 des enfants vaccinés avec l'anatoxine titrant 7 et 4,5 unités (2 injections) sont immunisés alors que l'anatoxine titrant 16 et 12,5 unités a immunisé dans les mêmes conditions 94,2 p. 100 des enfants.

Ces résultats obtenus chez un nombre assez important d'enfants et dans des conditions comparables montrent, soit dit en passant, la supériorité dans l'immunisation active des échantillons d'anatoxine possédant un titre élevé en unités anatoxiques (1). *Ils prouvent en outre que la valeur antigène intrinsèque telle qu'elle est estimée et chiffrée au moyen de la réaction de floculation est bien l'index, aussi exact qu'il est possible de le déterminer pratiquement, de l'action immunisante de l'anatoxine chez l'homme* (2).

*
* *

Il nous faut insister maintenant sur la facilité que donne la réaction de floculation de pouvoir à tout moment et dans n'importe quel laboratoire se rendre compte de la valeur de différents échantillons d'anatoxine.

(1) Avec MM. DEBRÉ et MOZER, nous ferons connaître, sous peu, les excellents résultats obtenus avec de tels échantillons.

(2) Nous pourrions ajouter ici que les heureux résultats acquis en France, où très régulièrement 94 à 97 p. 100 des sujets convenablement vaccinés (3 injections) présentent une réaction de Schick négative, sont dus en grande partie au fait que l'anatoxine délivrée par l'Institut Pasteur et que nous contrôlons nous-même par la floculation titre au moins 10 unités anatoxiques.

A de nombreuses reprises, nous avons eu l'occasion de titrer par la floculation des échantillons d'anatoxine dosés par la même réaction, dans d'autres laboratoires. Les résultats obtenus, de part et d'autre, ont toujours été suffisamment concordants. Nous reproduisons ici l'essai comparatif fait en liaison avec notre collègue S. Schmidt du laboratoire de

TABLEAU III.

MARQUE DES ÉCHANTILLONS	TITRAGES FAITS		
	à Copenhague avec l'étalon danois	à Paris	
		avec l'étalon danois	avec l'étalon français
B. S. 430	25,7 (1)	26	24,27
J. M. R. 389	25,2	26	24
B. 5050	15,5	15	15
B. 4039	15,3	14	13,5
B. 2359	13,6	12,5	12
7066	5,1	5	5,25
T. I.	12,3	12	12
C. 28.	11,7	12	12
V. 2	20,2	24	24
V. 1	19,7	20	21
V. 7	13,6	15	15

(1) Unités anatoxiques.

M. le professeur Madsen pour le compte de la « Commission de standardisation » de la S. D. N. Les échantillons d'anatoxine provenaient des laboratoires les plus divers (Angleterre, Autriche, Canada, Danemark, France, Pologne). Ils étaient soumis à la floculation à la fois à Copenhague et à Garches au moyen d'un sérum étalon danois et d'un sérum étalon français. Les résultats de cet essai sont exposés dans ce tableau III, établi par les soins du Dr S. Schmidt.

Il suffit de comparer les chiffres portés sur ce tableau pour se rendre compte que les résultats des dosages effectués au moyen de la méthode de floculation, et dans des conditions quelque peu différentes pourtant, sont d'une concordance tout à fait satisfaisante.

Il ressort à l'évidence de tous ces essais et de leurs résultats,

que la méthode de floculation est bien la méthode de choix (1), qui permet d'estimer avec une facilité et une précision incomparablement plus grandes que tout autre procédé le pouvoir antigène intrinsèque de l'anatoxine, véritable index de son pouvoir immunisant.

La valeur de la méthode de floculation pour la détermination de la valeur antigène intrinsèque de l'anatoxine va s'affirmer davantage encore dans l'étude que nous ferons de cette autre propriété de l'anatoxine : le pouvoir dissociant.

Pouvoir immunisant et puissance productrice d'antitoxine.

Si Fränkel, en 1890, a pu rendre des cobayes réfractaires à l'infection diphtérique en leur injectant 10, 20 cent. cubes de toxine chauffée à 65-70°; si nombre d'expérimentateurs, à la suite de Roux et Vaillard, ont pu, en injectant à des animaux des toxines modifiées par le liquide de Gram ou tout autre agent chimique, leur faire supporter des doses plus ou moins élevées de toxine active, il était admis comme un dogme, jusqu'à ces dernières années encore, que la production abondante d'antitoxine exige l'injection aux animaux de grosses quantités de toxines « fortes », c'est-à-dire de toxines très riches en poison spécifique.

Ehrlich lui-même était d'avis que les toxines naturellement ou artificiellement vieilles qu'il supposait contenir ce qu'il a appelé des « toxoïdes » entraînait seulement chez les animaux auxquels on les injecte un « fondement d'immunité » (Grundimmunität), mais que pour l'obtention d'antitoxine en quantités notables il faut un poison non modifié « unmodifizierte Gifte » (2). *Cette opinion a prévalu par la suite, et si pendant vingt-cinq ans on a pu parler sans cesse, à propos des théories de l'immunité, de ces substances hypothétiques dont Ehrlich*

(1) Dès 1925, GLENNY (*Journ. of Hyg.*, 24, p. 301) confirme les facilités que donne la floculation pour l'appréciation de la « force des toxines modifiées » en particulier. Voir à ce propos les travaux de S. Schmidt (de Copenhague).

(2) On trouvera une bibliographie assez complète de ces questions dans un article de H. Opitz (Breslau) in *Jahrbuch für Kinderhalkund*, 96, 1921, p. 19.

imagina l'existence pour les besoins d'une explication (1), aucune application pratique, digne de ce nom, n'a été réalisée (2), et pour cause !

Dreyer et Madsen, avec les « toxones », autres substances supposées qui, d'après Ehrlich, entrent dans la constitution de la toxine, auraient pu conférer au lapin une certaine résistance à l'intoxication, mais sans production notable d'anticorps.

D'autres expérimentateurs encore, Carl Brück par exemple, s'inspirant des mêmes conceptions d'Ehrlich, ont fait connaître que l'apparition de l'antitoxine exige une excitation que seuls peuvent provoquer les groupements toxophores de la toxine.

Plus près de nous, n'était-il pas très généralement admis que les mélanges T A de Behring pour se montrer efficaces dans l'immunisation active vis-à-vis de la diphtérie chez l'homme doivent contenir un excès de toxine ; exemple : les mélanges sous-neutralisés employés jusqu'à ces derniers temps aux États-Unis et que l'anatoxine vient de remplacer dans la plupart des contrées, sinon dans toutes.

Ce n'est donc pas une des moindres propriétés de l'anatoxine, qui ne contient pas de poison et qui est « irréversible » (nous le verrons plus loin), de provoquer une immunité au moins aussi prononcée et une production d'antitoxine au moins aussi intense que celles que peut réaliser le bouillon diphtérique qui a gardé toute sa nocivité. Cette propriété, qui suffirait à différencier l'anatoxine de tous les antigènes jusqu'ici connus, est utilisée journellement, depuis nombre d'années déjà, dans l'immunisation active de l'homme et dans la production de l'antitoxine diphtérique chez le cheval. Cette large utilisation consacre sa valeur ; nous tenons néanmoins à rapporter ici quelques expériences comparatives qui l'affirment davantage encore.

Prenons plusieurs lots de cobayes. Injectons aux animaux du premier lot une toxine diphtérique qui a été chauffée une heure à 65-70° ; elle tuait le cobaye, avant son chauffage, à la dose de 1/800^e de centimètre cube ; à ceux du deuxième lot, injectons une toxine de même pouvoir toxique que la précédente à l'origine et qui, après avoir séjourné durant vingt mois,

(1) Explication de la neutralisation de la toxine par l'antitoxine.

(2) Est-il besoin de dresser en regard le bilan, durant ces quelques dernières années, des applications de l'anatoxine.

alternativement à la température du laboratoire et à celle de l'étuve, se montre inoffensive pour l'animal; ceux du troisième lot reçoivent une anatoxine diphtérique qui a une valeur égale à 10 unités anatoxiques; à ceux d'un dernier lot, la même anatoxine chauffée une heure à 65-70°. Ces trois antigènes, remarquons-le, proviennent de bouillons diphtériques ayant sensiblement la même activité. Un mois après l'injection d'antigène, tous les animaux sont éprouvés avec des doses variables de toxine active. Les détails et les résultats de l'expérience sont énumérés ci-contre, tableau IV.

Ainsi les cobayes qui ont reçu, soit la toxine chauffée, soit la toxine rendue inoffensive par vieillissement (toxôide d'Erlich?) ne résistent pas même à 2 doses mortelles; ceux qui, dans des conditions comparables, ont été injectés avec l'anatoxine non chauffée ou chauffée, supportent facilement 50 doses mortelles et bien davantage. Ces résultats illustrent suffisamment ce que nous avons dit précédemment sans qu'il soit besoin d'y ajouter d'autres commentaires.

*
* *

Dès la découverte de l'anatoxine diphtérique (1923), nous l'avons proposée pour la préparation de l'antitoxine spécifique et nous l'avons utilisée dans ce but. Nous avons ainsi réalisé, durant sept ans, une vaste expérience portant actuellement sur plus d'un millier de chevaux. Tantôt l'immunisation de ces animaux a été assurée uniquement au moyen de l'anatoxine, tantôt elle a été commencée avec cette dernière, puis poursuivie avec la toxine; dans quelques cas enfin, elle a été effectuée avec la toxine seule, sous le couvert de l'immunisation passive au début.

Un tel essai portant sur un nombre aussi considérable d'animaux nous a fourni des résultats que nous avons déjà fait connaître dans certaines de nos publications. Nous compléterons et confirmerons ces résultats, en apportant d'abord un exemple de production comparée d'antitoxine, par la toxine d'une part, et par l'anatoxine d'autre part (1).

Deux séries de chacune 20 chevaux sont constituées, au hasard, sans tenir compte de l'immunité naturelle que peuvent

(1) *C. R. Soc. de Biol.*, 104, 1930, p. 842.

TABLEAU IV.

NATURE ET QUANTITÉ D'ANTIGÈNE reçu par le cobaye	NUMÉRO des cobayes	DOSES d'épreuve en doses mortelles	RÉSULTATS
<i>Lot n° 1 :</i>	18-19 21	2	+
1 cent. cube de toxine chauffée une heure à 65-70°	16-17 21	2	+
	12-13 21	5	+
	6-7 21	5	+
	2-3 21	10	+
<i>Lot n° 2 :</i>	78-79 48	2	+
1 cent. cube de toxine, vingt mois d'étuve et température ordinaire.	46-47 48	2	+
	16-17 48	10	+
	24-25 48	10	+
	8-9 48	50	+
5 cent. cubes de toxine, vingt mois d'étuve et température ordinaire.	94-95 48	2	+
	98-99 48	5	+
	32-33 48	10	+
	90-91 48	10	+
	82-83 48	50	+
	76-77 48	50	+
	64-65 48	100	+
	92-93 48	100	+
<i>Lot n° 3 :</i>	57-58 41	50	—
1 cent. cube d'anatoxine (non chauffée)	87-88 41	50	—
	39-40 41	50	+
	41-42 41	50	—
	42-42 41	100	+
	85-86 41	100	—
	63-64 41	100	—
5 cent. cubes d'anatoxine (non chauffée)	38-39 1	100	—
	14-15 1	100	—
	30-31 1	100	—
	22-23 1	100	—
	32-33 1	200	—
	16-17 1	200	—
	36-37 1	200	+
	18-19 1	200	—
	20-21 1	200	—
	9-10 1	200	+
	3-4 1	400	—
5 cent. cubes d'anatoxine (chauffée à 65-70)	7-8 1	400	—
	17-18 5	100	—
	15-16 5	100	—
	63-64 5	100	—
	77-78 5	200	—
	53-54 5	200	—
	41-42 5	200	+
	75-76 5	200	—
	39-40 5	400	+
	49-50 5	400	—

Le signe + indique que le cobaye a succombé et le signe — qu'il a résisté à l'épreuve.

présenter certains de ces animaux. Chacun des 40 chevaux reçoit d'abord 3 injections : 20, 40, 75 cent. cubes d'anatoxine diphtérique; les deux premières sont faites à neuf jours d'intervalle, la troisième, cinq jours après la seconde. Puis, pour l'une des séries (n° 1) l'hyperimmunisation est continuée avec des doses progressivement croissantes de toxine : 100, 150, 200, 300, 350, 400 cent. cubes injectées à quatre ou cinq jours d'intervalle; pour l'autre série (n° 2) l'immunisation est poursuivie avec l'anatoxine, aux mêmes doses, mêmes intervalles de temps, selon le même mode d'injection que pour la première série. Les deux tiers en volume de chacune des dernières doses, soit de toxine, soit d'anatoxine, sont additionnés d'un peu de tapioca, selon le procédé habituel. Les lots de toxine et d'anatoxine utilisés ont une valeur antigène intrinsèque sensiblement égale, elle est comprise entre 10 et 13 unités antigéniques (1). Neuf jours après la dernière injection, les chevaux sont saignés. Les dosages d'antitoxine dans les sérums sont effectués au moyen de la floculation, puis par la méthode *in vivo*.

On trouvera les résultats obtenus dans le tableau ci-joint :

Chevaux hyperimmunisés par la toxine (série n° 1).

NUMÉROS des chevaux	POUVOIR antitoxique des sérums (unités)	NUMÉROS des chevaux	POUVOIR antitoxique des sérums (unités)
1	420	10	650
2	700	11	250
3	1.500	12	350
4	1.100	13	350
5	500	14	400
6	550	15	450
7	850	16	1.000
8	1.000	17	1.200
9	300	18	700 (2)

(1) Ajoutons que les toxines, préparées par le Dr Loiseau et ses collaborateurs dans le service du Dr L. Martin, en tenant compte des modifications que nous avons récemment apportées à la constitution du milieu de culture (bouillon non fermenté glucosé), tiraient en moyenne durant ces six derniers mois de 13 à 15 unités, et cela pour une production de 100 à 150 litres par semaine. Pas une fois la valeur n'est descendue au-dessous de 10 unités au centimètre cube. Ceci prouve l'importance des améliorations réalisées dans la préparation du milieu de culture.

(2) Deux des chevaux de cette série sont morts avant la fin de l'hyperimmunisation.

Chevaux hyperimmunisés par l'anatoxine (série n° 2).

NUMÉROS des chevaux	POUVOIR antitoxique des sérums (unités)	NUMÉROS des chevaux	POUVOIR antitoxique des sérums (unités)
59	700	69	450
60	1.800	70	650
61	500	71	1.200
62	600	72	100
63	500	73	650
64	650	74	200
65	800	75	900
66	600	76	100
67	100	77	450
68	250	78	1.000

D'après ces résultats, les quantités d'antitoxine produites dans l'une et l'autre des deux séries sont sensiblement équivalentes : la valeur antitoxique moyenne des sérums de chaque série est, en effet, comprise entre 600 et 700 unités au centimètre cube. On constate, en outre, que les sérums obtenus avec l'anatoxine atteignent des titres aussi élevés que ceux préparés à l'aide de la toxine. Nous ferons remarquer que l'obtention de tels résultats, avec des quantités aussi faibles, exige l'emploi de toxine ou d'anatoxine de haute valeur intrinsèque : la qualité compense largement la quantité, d'où l'intérêt, que nous avons déjà signalé maintes fois, de préparer des antigènes de valeur élevée (1).

Voici encore un autre exemple qui montrera comment la production d'antitoxine peut être accélérée et intensifiée grâce à l'utilisation de l'anatoxine.

Vingt chevaux neufs qui possèdent ou non l'immunité naturelle se traduisant par une réaction de Schick négative reçoivent :

31 janvier . .	20 cent. cubes d'anatoxine diphtérique + tapioca
7 février . .	50 cent. cubes d'anatoxine diphtérique seule
12 février . .	75 cent. cubes d'anatoxine diphtérique seule
14 février . .	100 cent. cubes d'anatoxine diphtérique + tapioca
17 février . .	150 cent. cubes d'anatoxine diphtérique seule
20 février . .	250 cent. cubes d'anatoxine diphtérique seule
23 février . .	350 cent. cubes d'anatoxine diphtérique + tapioca
26 février . .	450 cent. cubes d'anatoxine diphtérique seule

(1) G. RAMON. C. R. de l'Académie des Sciences, 189, 1929, p. 718. Ces Annales, 45, 1930, p. 291.

L'hyperimmunisation dure ainsi vingt-cinq jours seulement, période durant laquelle 1.500 cent. cubes d'anatoxine à peine sont injectés à chaque cheval. La première saignée de rendement est faite trente-quatre jours après la première injection d'antigène (1). Voici les titres antitoxiques des sérums de cette saignée.

NUMÉROS des chevaux	TITRE des sérums en unités antitoxiques	NUMÉROS des chevaux	TITRE des sérums en unités antitoxiques
393.	1.000	405.	850
396.	250	406.	350
397.	1.000	407.	900
398.	700	408.	400
399.	1.100	409.	300
400.	850	410.	1.500
401.	650	411.	650
402.	600	412.	1.200
403.	300	413.	300
404.	600	414.	600

Une autre série de 19 chevaux a été soumise à l'hyperimmunisation dans les mêmes conditions que la série précédente, du 17 février au 12 mars, soit durant vingt-trois jours seulement. La première saignée pour la récolte des sérums a eu lieu le 20 mars. Le titrage des 19 sérums a fourni les résultats suivants.

NUMÉROS des chevaux	TITRE des sérums en unités antitoxiques	NUMÉROS des chevaux	TITRE des sérums en unités antitoxiques
436.	600	462.	550
437.	300	464.	600
438.	450	465.	1.000
450.	200	466.	250
456.	1.300	469.	1.000
457.	1.500	470.	200
458.	1.300	471.	2.000
459.	1.000	472.	275
460.	1.000	473.	650
461.	500		

(1) Dans d'autres séries nous avons substitué au tapioca le chlorure de calcium que E. Roux et Yersin avaient déjà cherché à utiliser dès 1889 au cours de leurs tentatives d'immunisation (*Ces Annales*, 3, p. 284) dans le but de ralentir la résorption de l'antigène. Nous avons obtenu des résultats sensiblement équivalents à ceux acquis avec le tapioca. L'addition de chlorure de calcium (1 gramme pour 100 cent. cubes d'anatoxine) donne de bons résultats lorsque, à la reprise des animaux, après les premières saignées, on l'alterne

Quelle est donc la méthode et quel est donc l'antigène qui permettent d'arriver en si peu de temps, avec un si faible volume injecté, à de tels résultats, et cela sans incident, les animaux restant en bonne santé et pouvant servir pendant de longs mois encore à la production de l'antitoxine?

Dans une communication récente (1), S. Schmidt, confirmant la valeur de l'anatoxine pour la production de l'antitoxine, a fait connaître les très bons résultats que l'on peut obtenir soit avec l'anatoxine ordinaire, soit avec l'anatoxine purifiée selon le procédé qu'il a mis au point, résultats qui, à plus d'un point de vue, se montrent supérieurs à ceux atteints avec la toxine.

*
* *

On peut se demander, et nous nous sommes demandé dès le début de nos recherches, si l'antitoxine obtenue grâce à l'anatoxine est identique, dans ses propriétés, à l'antitoxine dont le bouillon toxique provoque la formation. Jusqu'ici, aucun fait n'a permis de mettre en doute cette identité et il est impossible de discerner si un échantillon d'antitoxine donné a été produit en utilisant la toxine ou bien son dérivé inoffensif, l'anatoxine.

L'expérimentation chez les animaux nous révèle, en effet, la même fonction neutralisante de l'antitoxine, que celle-ci soit préparée au moyen de la toxine ou à l'aide de l'anatoxine.

L'expérimentation *in vitro* met en évidence la fonction floculante de l'antitoxine, et la réaction de floculation permet d'apprécier en dehors du pouvoir antitoxique une nouvelle qualité de l'antitoxine qui se traduit par une vitesse de floculation plus ou moins rapide (2). Or, en soumettant à la réaction de floculation le sérum des chevaux immunisés soit avec la

avec celle de tapioca. Avec notre collègue E. Lemétayer nous avons également utilisé concurremment le tapioca, le chlorure de calcium, dans des essais de production d'antitoxine tétanique qui nous ont permis d'obtenir des résultats non encore atteints jusqu'ici. *C. R. Académie des Sciences*, **191**, 1930, p. 1393, et *C. R. Soc. de Biol.*, **106**, 1931, p. 71.

(1) S. SCHMIDT. *C. R. Soc. de Biol.*, **106**, 1931, p. 765-767.

(2) On tend de plus en plus à considérer cette vitesse de floculation comme la manifestation visible de l'« affinité » de l'antitoxine pour la toxine (voir les recherches de Madsen et Schmidt et les nôtres).

toxine, soit avec l'anatoxine, nous avons constaté que la vitesse de floculation des sérums obtenus par l'anatoxine est de même ordre que celle des sérums préparés avec la toxine. Nous avons d'ailleurs montré antérieurement que la propriété de l'antitoxine diphtérique qui se manifeste par cette vitesse de floculation varie suivant les individus (et aussi suivant l'espèce) et non avec l'antigène utilisé (1).

Ainsi, l'antitoxine diphtérique, produite chez le cheval, par exemple, par l'antigène spécifique, sous sa forme nocive (toxine) ou sous sa forme inoffensive (anatoxine), est « une » dans ses propriétés. Seule, la valeur des diverses propriétés de l'antitoxine varie; elle varie avec le pouvoir intrinsèque de l'antigène utilisé, que celui-ci s'appelle toxine ou anatoxine; elle varie aussi avec certains facteurs appartenant à l'organisme producteur.

Pouvoir dissociant (2).

Sa relation directe avec le pouvoir floculant.

L'anatoxine diphtérique ajoutée à un mélange neutre de toxine et d'antitoxine spécifique dissocie ce mélange et, s'unissant à l'antitoxine, libère une portion plus ou moins grande de toxine, de telle sorte que le complexe toxine + antitoxine + anatoxine se montre toxique pour le cobaye auquel on l'injecte.

Cette propriété bien particulière à l'anatoxine (3) va nous permettre d'affirmer encore l'importance de la réaction de floculation dans l'estimation des diverses propriétés de l'anatoxine.

Choisissons par exemple trois échantillons d'anatoxine diphtérique titrant respectivement d'après la floculation : 20-7 et 4 unités antigéniques. Prenons également à titre com-

(1) Voir en particulier : C. R. Soc. de Biol., 97, 1927, p. 635, et 102, 1929, p. 287, 379, 381. G. RAMON, R. DEBRÉ, M. et G. MOZER. C. R. Soc. Biol., 104, 1930, p. 838.

(2) Voir G. RAMON. C. R. Soc. de Biol., 104, 1930, p. 31 et 41, et 105, p. 173.

(3) Constatée pour la première fois par HENSEVAL et NELIS. C. R. Soc. de Biol., 91, 1920, 1924, p. 902, elle a été bien mise en évidence par MADSEN et SCHMIDT. C. R. Soc. de Biol., 102, 1929, p. 1091 et par H. SCHMIDT et SCHOLZ. Zeitsch. f. Immunitätsforsch., 64, 1929, p. 626.

paratif une toxine vieillie par un séjour de dix mois à l'étuve à 38°; cette toxine a perdu presque toute sa nocivité (1). Préparons d'un autre côté des mélanges de toxine et d'antitoxine diphtérique neutres (pour le cobaye) de façon que chacun d'eux contienne une dose Lo de toxine et une unité antitoxique

TABLEAU V.

MÉLANGES NEUTRES de toxine et d'antitoxine diphtériques	QUANTITÉ D'ANATOXINE en cent. cubes ajoutée à chaque mélange	ÉTAT DE L'ANIMAL après l'injection du complexe toxine + antitoxine + anatoxine
1 dose Lo T + 1 U. A.	0	Sain.
	1/10° à 20 unités	Mort le 15 ^e jour.
	1/50° à 20 unités	Mort le 6 ^e jour.
	1/30° à 20 unités	Mort le 4 ^e jour.
	1/40° à 20 unités	Mort en 48 heures.
	1/3 à 20 unités	Mort en 24 heures.
1 dose Lo T + 1 U. A.	0	Sain le 20 ^e jour.
	1/50° à 7 unités.	Sain le 20 ^e jour.
	1/30° à 7 unités	Mort le 9 ^e jour.
	1/10° à 7 unités.	Mort le 4 ^e jour.
	1/3 à 7 unités.	Mort en 60 heures.
	1 à 7 unités.	Mort en 36 heures.
1 dose Lo T + 1 U. A.	0	Sain le 20 ^e jour.
	1/50° à 4 unités.	Sain le 20 ^e jour.
	1/30° à 4 unités.	Sain le 20 ^e jour.
	1/10° à 4 unités.	Mort le 6 ^e jour.
	1/3 à 4 unités.	Mort le 3 ^e jour.
	1 à 4 unités.	Mort en 36 heures.
1 dose Lo T + 1 U. A.	1/10° de toxine, 18 mois d'étuve.	Sain le 20 ^e jour.
	1/3 de toxine, 18 mois d'étuve.	Petite escarre le 10 ^e jour. reste en bon état.
	1 de toxine, 18 mois d'étuve.	Mort le 6 ^e jour.
	2 de toxine, 18 mois d'étuve.	Mort le 4 ^e jour.

provenant d'un même sérum antidiphtérique. Ces mélanges étant répartis en quatre séries et constitués depuis quinze minutes, additionnons-les respectivement de quantités progressivement décroissantes de chacun des trois échantillons d'anatoxine et de l'échantillon de toxine. Vingt minutes après cette addition, injectons les complexes toxine-antitoxine-anatoxine ainsi formés sous la peau de cobayes de 250 grammes. L'expérience est disposée comme le montre le tableau V, qui en fait connaître également les résultats.

(1) Puisque injectée à la dose de 5 cent. cubes sous la peau d'un cobaye elle ne provoque qu'un peu d'œdème à l'endroit de l'injection.

Les différents mélanges neutres que nous avons constitués sont donc devenus toxiques sous l'influence de l'anatoxine qui tire son origine d'une transformation irréversible de la toxine et qui est douée d'une innocuité parfaitement stable.

La dissociation des mélanges neutres et leur transformation en mélanges nocifs ne peuvent évidemment s'expliquer que par l'affinité spécifique de l'anatoxine pour l'antitoxine, cela même si l'antitoxine a déjà contracté ou est sur le point de contracter une union plus ou moins fragile avec la toxine du mélange. L'anatoxine semble agir d'autant plus fortement, nous le constatons ici, que son pouvoir floculant exprimé en unités antigéniques est plus élevé. Nous ferons remarquer, en outre, le pouvoir dissociant très faible dont fait preuve la toxine rendue inoffensive par un séjour de dix-huit mois à la température de l'étuve et à celle du laboratoire alternativement, toxine devant contenir, suivant l'hypothèse d'Ehrlich, des « toxoïdes ». Cette toxine, au moment de sa préparation, tuait le cobaye au 1/800 de cent. cube et avait une valeur intrinsèque correspondant à 10 unités.

Ces expériences que nous venons de rapporter ont été effectuées avec quelques échantillons d'anatoxine obtenus à l'aide de lots de toxine préparés d'une façon analogue à celle de la toxine entrant dans la constitution du mélange toxine-antitoxine. Ces conditions ayant pu influencer sur les résultats, entreprenons donc de nouveaux essais avec de nombreux échantillons commerciaux d'anatoxine provenant de divers laboratoires et préparés en partant de lots de toxine obtenus eux-mêmes à l'aide de milieux de culture de confection et de composition fort variées.

Dans ces nouveaux essais, nous déterminons d'abord le pouvoir floculant en opérant selon la méthode habituelle. Nous recherchons et estimons ensuite le « pouvoir dissociant » en suivant la technique établie ci-dessus. On trouvera dans le tableau VI la disposition et les résultats de ces essais.

En consultant ce tableau, nous remarquons tout d'abord que, quelle que soit la provenance des échantillons d'anatoxine examinés, que ces échantillons aient été préparés dans des laboratoires divers, à partir de milieux de culture très différents, qu'ils aient été additionnés, comme certains d'entre eux,

TABLEAU VI.

MÉLANGES NEUTRES de toxine et d'antitoxine diphtériques	QUANTITÉ D'ANATOXINE en cent. cubes (échantillons divers) ajoutée à chaque mélange	ÉTAT DE L'ANIMAL après injection du complexe toxine + antitoxine + anatoxine
1 dose Lo T + 1 U. A.	0	Sain.
	1/5° C. C. (1) à 1/2 unité (2)	Mort en 5 jours.
	1/2 C. C. à 1/2 unité	Mort en 2 j. 1/2.
	1 C. C. à 1/2 unité	Mort en 2 j. 1/2.
	2 C. C. à 1/2 unité	Mort en 2 j. 1/2.
1 dose Lo T + 1 U. A.	4 C. C. à 1/2 unité	Mort en 2 jours.
	1/20° A. P. 138 jours à 1,5 unité	Survit.
	1/10° A. P. 138 jours à 1,5 unité	Survit.
	1/5° A. P. 138 jours à 1,5 unité	Mort en 5 jours.
	1/2 A. P. 138 jours à 1,5 unité	Mort en 2 jours.
1 dose Lo T + 1 U. A.	1 A. P. 138 jours à 1,5 unité	Mort en 1 j. 1/2.
	2 A. P. 138 jours à 1,5 unité	Mort en 1 j. 1/2.
	1/20° B. K. 13 à 2 unités	Survit.
	1/10° B. K. 13 à 2 unités	Survit.
	1/5° B. K. 13 à 2 unités	Mort en 3 jours.
1 dose Lo T + 1 U. A.	1/2 B. K. 13 à 2 unités	Mort en 3 jours.
	1 B. K. 13 à 2 unités	Mort en 2 jours.
	2 B. K. 13 à 2 unités	Mort en 2 jours.
	1/30° I. F. I. à 3 unités	Survit.
	1/20° I. F. I. à 3 unités	Survit.
1 dose Lo T + 1 U. A.	1/10° I. F. I. à 3 unités	Mort en 8 jours.
	1/5° I. F. I. à 3 unités	Mort en 3 jours.
	1/2 I. F. I. à 3 unités	Mort en 1 j. 1/2.
	1 I. F. I. à 3 unités	Mort en 1 j. 1/2.
1 dose Lo T + 1 U. A.	1/30° S. à 3,5 unités	Survit.
	1/20° S. à 3,5 unités	Survit.
	1/10° S. à 3,5 unités	Mort en 4 jours.
	1/5° S. à 3,5 unités	Mort en 3 jours.
	1/2 S. à 3,5 unités	Mort en 1 j. 1/2.
1 dose Lo T + 1 U. A.	1 S. à 3,5 unités	Mort en 1 j. 1/2.
	1/20° B. G. 13 à 4,5 unités	Survit jusqu'au 15° jour .
	1/10° B. G. 13 à 4,5 unités	Mort en 3 jours.
	1/5 B. G. 13 à 4,5 unités	Mort en 2 j. 1/2.
	1/2 B. G. 13 à 4,5 unités	Mort en 1 j. 1/2.
1 dose Lo T + 1 U. A.	1 B. G. 13 à 4,5 unités	Mort en 1 j. 1/2.
	1/30° A. B. à 5 unités	Survit.
	1/20° A. B. à 5 unités	Mort en 6 jours.
	1/10° A. B. à 5 unités	Mort en 4 jours.
	1/5° A. B. à 5 unités	Mort en 2 jours.
1 dose Lo T + 1 U. A.	1/2 A. B. à 5 unités	Mort en 1 j. 1/2.
	1 A. B. à 5 unités	Mort en 1 j. 1/2.
	1/50° B. G. 88 à 7,5 unités	Survit.
	1/30° B. G. 88 à 7,5 unités	Mort en 5 jours.
	1/20° B. G. 88 à 7,5 unités	Mort en 3 jours.
1 dose Lo T + 1 U. A.	1/10° B. G. 88 à 7,5 unités	Mort en 2 jours.
	1/5° B. G. 88 à 7,5 unités	Mort en 1 j. 1/2.
	1/2 B. G. 88 à 7,5 unités	Mort en 1 j. 1/2.

(1) Désignation de l'échantillon.

(2) Valeur en unités floculantes.

MÉLANGES NEUTRES de toxine et d'antitoxine diphthériques	QUANTITÉ D'ANATOXINE en cent. cubes (échantillons divers) ajoutée à chaque mélange	ÉTAT DE L'ANIMAL après injection du complexe toxine + antitoxine + anatoxine
I dose Lo T + 1 U.A.	1/50 ^e D. C. à 11 unités (3)	Survit.
	1/30 ^e D. C. à 11 unités	Mort en 7 jours.
	1/20 ^e D. C. à 11 unités	Mort en 3 jours.
	1/10 ^e D. C. à 11 unités	Mort en 2 jours.
	1/5 ^e D. C. à 11 unités	Mort en 1 j. 1/2.
	1/2 D. C. à 11 unités	Mort en 1 j. 1/2.
I dose Lo T + 1 U.A.	1/50 ^e I. P. G. I. à 16 unités	Mort en 5 jours.
	1/30 ^e I. P. G. I. à 16 unités	Mort en 3 jours.
	1/20 ^e I. P. G. I. à 16 unités	Mort en 4 jours.
	1/10 ^e I. P. G. I. à 16 unités	Mort en 2 jours.
	1/5 ^e I. P. G. I. à 16 unités	Mort en 2 jours.
	1/2 I. P. G. I. à 16 unités	Mort en 24 heures.
I dose Lo T + 1 U.A.	1/100 ^e I. P. G. II à 20 unités	Mort en 15 jours.
	1/50 ^e I. P. G. II à 20 unités	Mort en 4 jours.
	1/30 ^e I. P. G. II à 20 unités	Mort en 3 jours.
	1/20 ^e I. P. G. II à 20 unités	Mort en 2 jours.
	1/10 ^e I. P. G. II à 20 unités	Mort en 1 j. 1/2.
	1/5 ^e I. P. G. II à 20 unités	Mort en 1 j. 1/2.
I dose Lo T + 1 U.A.	1/2 I. P. G. II à 20 unités	Mort en 24 heures.
	1/10 ^e de toxine, 18 mois d'étuve < 1 unité.	Survit.
	1/5 ^e de toxine, 18 mois d'étuve < 1 unité.	Survit.
	1/2 de toxine, 18 mois d'étuve < 1 unité.	Survit.
	1 de toxine, 18 mois d'étuve < 1 unité.	Mort en 5 jours.
	2 de toxine, 18 mois d'étuve < 1 unité.	Mort en 3 jours.

(3) Flocculation lente.

d'antiseptiques variés (phénol, toluol), etc., qu'ils aient une grande valeur ou une valeur minime, la réaction de flocculation a pu être mise en œuvre avec succès (1).

De plus, les résultats de ces nombreux essais montrent la relation directe qui existe entre le « pouvoir dissociant » des différents échantillons d'anatoxine et leur pouvoir flocculant. *La réaction de flocculation permet donc d'apprécier non seulement le pouvoir saturant et le pouvoir immunisant, mais encore le pouvoir dissociant de l'anatoxine, toutes propriétés dont l'ensemble constitue ce que nous avons appelé la valeur antigène intrinsèque.*

(1) Faisons-le remarquer, nombre de ces échantillons commerciaux ont une valeur antigène et un pouvoir dissociant bien faibles, aussi leur activité immunisante s'est-elle montrée chez le cobaye très réduite.

Stabilité en général et résistance à la chaleur en particulier.

Déjà, en 1928, nous avons pu montrer que l'anatoxine diphtérique conserve intégralement ses propriétés durant cinq années au moins (1).

Nous avons examiné récemment des échantillons d'anatoxine gardés depuis plus de sept années, soit à la température du laboratoire (moyenne $+18-22^{\circ}$), soit à celle de la chambre froide ($+1^{\circ} + 5^{\circ}$). Nous nous sommes rendu compte que l'anatoxine placée dans ces conditions avait conservé intactes ses différentes propriétés : innocuité; pouvoir floculant (seule la vitesse de floculation est un peu retardée), valeur antigène intrinsèque et activité immunisante.

On conçoit combien cette stabilité dans le temps est précieuse pour l'utilisation de l'anatoxine dans la pratique de l'immunisation active vis-à-vis de la diphtérie.

*
* *

L'anatoxine diphtérique, ceci est un fait acquis (2) depuis longtemps déjà, se montre relativement plus résistante au chauffage que la toxine d'où elle dérive. La toxine diphtérique, en effet, chauffée une heure à $65-70^{\circ}$, a perdu presque toute sa nocivité; elle ne flocule plus en présence d'antitoxine; injectée même à grosses doses répétées à l'animal d'expériences, elle n'instaure en lui qu'une immunité bien faible (Fränkel) à peine décelable. Or, une anatoxine peut être chauffée à 65° et même à 70° elle conserve intégralement son pouvoir floculant et par conséquent sa valeur antigène intrinsèque, aussi est-elle capable d'engendrer l'immunité et la production d'antitoxine au même titre que l'anatoxine non chauffée, nous en avons fourni plus haut la preuve expérimentale.

Montrons ici que son pouvoir dissociant est conservé. Dans ce but, préparons un certain nombre de mélanges neutres de

(1) Voir pour les détails : Ces *Annales*, 42, 1928, p. 959.

(2) Voir en particulier G. Ramon : *C. R. Acad. des Sciences*, 179, 1924, p. 422.

toxine et d'antitoxine diphtériques (1 Lo + 1 unité antitoxique) et ajoutons à ces mélanges des quantités variables d'anatoxine spécifique (10 unités) chauffée à différentes températures.

A titre de comparaison, effectuons la même expérience avec une toxine rendue inoffensive par vieillissement à la température du laboratoire et à celle de l'étuve.

Voici la disposition des expériences avec les résultats qu'elles fournissent :

TABLEAU VII.

MÉLANGES NEUTRES de toxine et d'antitoxine diphtériques	QUANTITÉ D'ANATOXINE en cent. cubes ajoutée à chaque mélange	ÉTAT DE L'ANIMAL après injection du complexe toxine + antitoxine + anatoxine
1 dose Lo T + 1 U. A.	1/10 d'anatoxine non chauffée. 1/3 d'anatoxine non chauffée.	Mort en 2 j. 1/2. Mort en 36 heures.
1 dose Lo T + 1 U. A.	1/10 d'anatoxine chauffée 45 minutes à 70°. 1/3 d'anatoxine chauffée 45 minutes à 70°.	Mort en 4 jours. Mort en 36 heures.
1 dose Lo T + 1 U. A.	1/10 d'anatoxine chauffée 15 minutes à 80°. 1/3 d'anatoxine chauffée 15 minutes à 80°.	Mort en 6 jours. Mort en 48 heures.
1 dose Lo T + 1 U. A.	1/3 d'anatoxine chauffée 10 minutes à 100°. 1 d'anatoxine chauffée 10 minutes à 100°.	Mort en 7 jours. Mort en 2 j. 1/2.
1 dose Lo T + 1 U. A.	1/3 de toxine vieillie non chauffée. 1 de toxine vieillie non chauffée.	Survit. Mort en 6 jours.
1 dose Lo T + 1 U. A.	1 de toxine vieillie chauffée 45 minutes à 70°. 3 de toxine vieillie chauffée 45 minutes à 70°.	Survit. Survit.
1 dose Lo T + 1 U. A.	1 de toxine vieillie chauffée 15 minutes à 80°. 3 de toxine vieillie chauffée 15 minutes à 80°.	Survit. Survit.
1 dose Lo T + 1 U. A.	1 de toxine vieillie chauffée 10 minutes à 100°. 3 de toxine vieillie chauffée 10 minutes à 100°.	Survit. Survit.

Ces expériences soulignent la différence qui existe entre l'anatoxine et la toxine vieillie (toxoides?). Elles nous indiquent en outre que ce n'est guère qu'à partir de 80° que l'anatoxine commence à être atteinte dans certaines de ses propriétés essentielles.

Servons-nous maintenant de la différence de résistance à la chaleur, de la toxine fraîchement filtrée et de l'anatoxine, pour chercher à nous rendre compte de la marche et du mécanisme de la transformation de la toxine en son dérivé anatoxique.

Prenons 1 litre de toxine diphtérique dont la valeur antigène intrinsèque est égale à 10 unités, additionnons-le de 4 cent. cubes de formol et plaçons-le à l'étuve. Si après vingt-quatre heures seulement de séjour à l'étuve on prélève un échantillon de cette toxine formolée et si on le chauffe à 68° pendant trois quarts d'heure, cet échantillon soumis ensuite à l'épreuve de la floculation se comporte comme la toxine fraîche sans formol qui, chauffée à 68-70°, ne flocule plus d'une façon appréciable. Si, après quatre jours d'exposition de la même toxine formolée à la température de l'étuve, on prélève un nouvel échantillon que l'on soumet au chauffage à 68°, on constate que, mis en présence de l'antitoxine, cet échantillon flocule; mais, alors que 1 cent. cube de la même toxine, fraîche, non formolée et non chauffée, exige 10 unités antitoxiques pour floculer, 1 cent. cube de l'échantillon qui a subi pendant quatre jours le contact du formol et de la chaleur demande seulement, pour entrer en floculation, 5 unités antitoxiques, et la vitesse de floculation est très ralentie.

Par la suite, l'échantillon chauffé flocule en présence de quantités d'anatoxine qui vont en augmentant; la vitesse de floculation s'accélère. Finalement, le trentième jour, lorsque tout pouvoir toxique a disparu, lorsque la toxine est complètement transformée en anatoxine, cette anatoxine, chauffée à 68°, se comporte comme l'échantillon non chauffé, elle flocule en présence de 10 unités anatoxiques.

De ces expériences, retenons ceci : *c'est seulement lorsque toute trace de poison a disparu, que le dérivé de la toxine offre intégralement la résistance au chauffage qui représente bien l'un des caractères essentiels de ce nouvel antigène qu'est l'anatoxine.*

Irréversibilité.

Avant de proposer l'anatoxine pour la vaccination de l'homme vis-à-vis de la toxi-infection diphtérique, nous nous sommes rendu compte que le processus qui aboutit à la transformation de la toxine en son dérivé inoffensif est bien irréversible et que l'anatoxine ne risque pas de devenir toxique dans l'organisme vivant.

On sait que le complexe toxine-antitoxine est dissociable (1); nous avons montré, par exemple, que du flocculat toxine-antitoxine on peut extraire une proportion plus ou moins forte d'antitoxine; d'autres expérimentateurs ont établi que sous diverses influences — addition d'acides, de sels, d'antiseptiques, etc. — le mélange neutre de toxine diphtérique et de sérum spécifique peut récupérer une certaine toxicité (Morgenroth, Madsen et Schmidt, Glenney, etc.). Or, malgré tous les agents physiques, chimiques ou biologiques mis en jeu, il a été impossible d'obtenir que l'anatoxine puisse présenter la totalité ou une partie infime seulement de la nocivité spécifique qui caractérise la toxine dont elle est le dérivé. Cette stabilité dans l'innocuité a été confirmée par l'injection de l'anatoxine à des dizaines de milliers d'animaux d'expériences et à plusieurs millions d'individus.

Divers auteurs ont signalé qu'une toxine diphtérique filtrée depuis plus ou moins longtemps peut, dans certaines conditions, manifester un accroissement de sa toxicité par son mélange avec du bouillon, avec de l'eau peptonée par exemple (Walbum, Dernby, etc.). D'après les recherches de H. Schmidt et Scholz, cet accroissement de toxicité serait dû au fait que certaines substances contenues dans la toxine et que ces expérimentateurs assimilent aux toxoïdes de la théorie d'Ehrlich, peuvent récupérer la toxicité qu'elles ont perdue et se transformer en toxine. Selon H. Schmidt et W. Scholz (de Marburg) et aussi S. Schmidt (de Copenhague), la réaction toxine \rightarrow toxoïde serait donc réversible : toxine \rightleftharpoons toxoïde. En utilisant les moyens employés par Walbum, H. Schmidt, etc., pour la toxine, nous avons cherché à faire récupérer à l'anatoxine un peu de la toxicité du poison diphtérique. Nous n'y sommes jamais parvenu. Nous avons préparé par exemple des mélanges d'anatoxine et de bouillon (qui sert à la préparation de la toxine), d'anatoxine et d'eau peptonée. Après exposition à la température de l'étuve, soit pendant cinq heures, soit pendant vingt-quatre heures, nous avons injecté ces mélanges à des cobayes;

(1) C'est grâce à leur réversibilité que, d'après divers auteurs, les mélanges « toxine-antitoxine » pourraient faire acte d'antigène *in vivo* : l'organisme injecté serait capable de dissocier le mélange, de mettre graduellement en liberté la toxine qui provoquerait ainsi l'apparition de l'antitoxine.

ces animaux n'ont présenté par la suite ni symptômes ni lésions d'intoxication diphtérique.

Ces expériences, en affirmant encore l'irréversibilité de l'anatoxine, prouvent en outre, s'il en est besoin, que cet antigène ne saurait être apparenté, même de loin, aux hypothétiques « toxoïdes » dont l'existence véritable n'a jamais été démontrée, non plus que celles des nombreuses substances qui, selon la conception d'Ehrlich, entreraient dans la composition du bouillon diphtérique frais ou vieilli : prototoxine, deutérottoxine, tritotoxine, toxone, etc., prototoxoïde, syntoxoïde, etc.

*
* *

Au lieu de supposer, avec Ehrlich, la toxine diphtérique comme étant composée d'une pluralité de substances capables de posséder des propriétés différentes (au point de vue pouvoir pathogène, affinité pour l'antitoxine, etc.), n'est-il pas plus simple et plus logique d'admettre que, sous des influences diverses, la « molécule toxine » peut se trouver modifiée, dans sa constitution, l'ensemble des molécules toutes également modifiées formant un corps nouveau dont les propriétés sont plus ou moins différentes de celles de l'ancien et sont en rapport avec la nature et l'intensité des modifications subies par chaque molécule (1).

Nous pouvons, pour tâcher de mieux saisir le mécanisme de la transformation de la toxine en anatoxine, qui nous intéresse ici, reprendre, en l'adaptant quelque peu, la comparaison, fort juste à notre avis, dont s'est servi Bordet pour expliquer le mode d'union de l'antitoxine et de la toxine. On peut, en effet, comparer l'effet du formol sur la toxine à celui d'un colorant sur du papier. Le formol, au lieu de se porter sur quelques molécules toxiques en respectant les autres, se répartit sur toutes, qu'il modifie progressivement, de même

(1) S. SCHMIDT (de Copenhague) ne rappelait-il pas récemment (*C. R. Société de Biologie*, 103, 1930, p. 273), et fort à propos, qu'une simple variation physico-chimique d'une substance peut modifier sa nature. Exemple : le phosphore rouge et le phosphore jaune qui, sous deux formes différentes, donnent des combinaisons chimiques identiques ; il rappelait encore qu'une faible différence dans la constitution de la molécule peut modifier profondément les propriétés physiologiques. Exemple : la choline et le muscarine.

qu'une solution de couleur dans laquelle on plonge des feuilles de papier leur communique à toutes une teinte uniforme qui devient de plus en plus foncée. Entre la blancheur des feuilles primitivement intactes et la teinte ultérieurement foncée de ces feuilles qui ont pu satisfaire entièrement leur avidité pour la couleur, s'intercalent toute une série de nuances intermédiaires; ainsi se placent entre la toxine et l'anatoxine toute une série de produits de transition, dont chacun ayant une composition propre possède aussi des qualités particulières.

N'avons-nous pas vu, par exemple, que les échantillons prélevés au cours de la transformation d'une toxine par le formol se comportent différemment dans certaines de leurs propriétés : pouvoir toxique, résistance au chauffage, par exemple. Dans ces échantillons incomplètement transformés, il ne saurait y avoir des molécules d'anatoxine à côté de molécules de toxine inchangées, mais seulement des molécules toutes altérées au même degré, d'où les propriétés différentes de l'ensemble, suivant le degré d'altération commun à toutes les molécules.

C'est ainsi qu'à un moment donné nous nous trouvons en présence d'un dérivé nouveau qui a perdu complètement l'un des caractères particuliers à la toxine : le pouvoir nocif, qui a gardé intégralement certaines propriétés de celle-ci : la spécificité, le pouvoir floculant, la valeur antigène intrinsèque, l'activité immunisante et qui, enfin, fait preuve de qualités propres : le pouvoir dissociant, la stabilité en général, la résistance relativement élevée à divers agents physiques ou chimiques, l'irréversibilité.

Les propriétés de l'anatoxine extraite du floculat spécifique.

En collaboration avec R. Legroux et M. Schoen, nous avons réussi récemment à extraire l'anatoxine du floculat spécifique (1). Nous avons indiqué qu'il suffit pour libérer l'anatoxine de son union avec l'antitoxine, et pour lui permettre de recouvrer une part plus ou moins grande de son activité, de chauffer par exemple à 82° pendant vingt minutes ou à 100° pendant

(1) *C. R. Académie des Sciences*, 192, 1931, p. 512, et *C. R. Société de Biologie*, 106, 1931, p. 525 et 719. Ces recherches seront exposées en détail dans un Mémoire spécial.

dix minutes le flocculat issu du mélange d'anatoxine de sérum antidiphtérique et remis en solution dans l'eau distillée; dans ces conditions, l'antitoxine est, sinon détruite complètement, du moins rendue inactive, et l'anatoxine se trouve, par contre, en grande partie libérée.

Dans une série d'essais, poursuivis avec R. Legroux et M. Schoen, nous avons fait varier la température d'extraction et nous avons étudié son influence sur certaines des propriétés principales de l'anatoxine : pouvoir flocculant, pouvoir dissociant, pouvoir immunisant. Dans ces essais, nous utilisons des solutions de flocculat spécifique préparé de la façon suivante : à 400 cent. cubes par exemple d'anatoxine, on ajoute une quantité de sérum antidiphtérique égale, ou très légèrement inférieure à celle qui doit provoquer la « flocculation initiale » ; dès l'apparition de la flocculation, on centrifuge, puis, après lavage à l'eau physiologique, le flocculat est additionné d'une quantité d'eau distillée (pH 6,5), équivalente au $\frac{1}{4}$ du volume du mélange primitif d'anatoxine et de sérum.

Si l'on porte la solution de flocculat préparée à des températures de plus en plus élevées, on remarque que c'est après un chauffage à 75° , pendant une demi-heure par exemple, qu'elle commence à manifester sa propriété de flocculer à nouveau en présence d'antitoxine, ce qui traduit ici le début de la récupération d'anatoxine. En élevant la température, on accroît en quantité l'anatoxine récupérée, mais la vitesse de flocculation se ralentit quelque peu. Aussi, pour apprécier plus facilement le pouvoir flocculant des échantillons récupérés à des températures supérieures à 82° , il est plus pratique de mélanger la solution de flocculat chauffée avec parties égales d'une anatoxine fraîchement préparée dont on connaît le titre ; on opère, en somme, selon un procédé analogue à celui qui permet de doser par flocculation l'antitoxine d'un sérum chauffé ou purifié. Le chauffage de la solution à 100° pendant dix minutes n'altère pas la valeur en unités flocculantes de l'anatoxine ainsi récupérée. A partir de 105° , cette valeur commence à baisser ; cependant, à 120° elle n'est pas encore complètement abolie. Ajoutons que le pouvoir flocculant de l'anatoxine ordinaire se montre relativement plus sensible à l'action de la chaleur ; en effet, s'il résiste facilement à 70° , et même 80° (alors que la toxine,

rappelons-le, est très altérée sinon détruite), un chauffage de dix minutes à 100°, par exemple, l'atteint notablement.

Ces fluctuations du pouvoir flocculant de l'anatoxine récupérée, suivant la température d'extraction, nous les retrouvons dans le pouvoir dissociant. Ceci n'a rien qui puisse nous étonner puisque, nous l'avons vu (1), le pouvoir dissociant est en relation directe avec la valeur antigène intrinsèque de l'anatoxine, c'est-à-dire avec sa valeur en unités flocculantes. Reproduisons ici les résultats de quelques expériences effectuées avec des échantillons récupérés à différentes températures et ajoutés en quantités variables à des mélanges Lo.

TABLEAU VIII.

MÉLANGES NEUTRES de toxine et d'antitoxine	QUANTITÉ D'ANATOXINE en cent. cubes (récupérée à différentes températures)	ÉTAT DE L'ANIMAL après injection du complexe toxine + antitoxine + anatoxine récupérée
1 dose Lo T + 1 U. A.	+1 solution flocculat chauffée 20 min. à 82°.	Cobaye mort en 36 h.
	+1/3 solution flocculat chauffée 20 min. à 82°.	Cobaye mort en 48 h.
	+1/10 solution flocculat chauffée 20 min. à 82°.	Cobaye mort en 3 j.
1 dose Lo T + 1 U. A.	+1/30 solution flocculat chauffée 20 min. à 82°.	Cobaye survit au delà de 6 j.
	+1 solution flocculat chauffée 10 min. à 100°.	Cobaye mort en 30 h.
	+1/3 solution flocculat chauffée 10 min. à 100°.	Cobaye mort en 36 h.
1 dose Lo T + 1 U. A.	+1/10 solution flocculat chauffée 10 min. à 100°.	Cobaye mort en 40 h.
	+1/30 solution flocculat chauffée 10 min. à 100°.	Cobaye mort en 3 j.
	+1/50 solution flocculat chauffée 10 min. à 100°.	Cobaye mort en 4 j.
1 dose Lo T + 1 U. A.	+1 solution flocculat chauffée 10 min. à 120°.	Cobaye mort en 6 j.
	+1/3 solution flocculat chauffée 10 min. à 120°.	Cobaye mort en 6 j.
1 dose Lo T + 1 U. A.	1 solution flocculat non chauffée . .	Cobaye survit.
	1/3 solution flocculat non chauffée . .	Cobaye survit.
1 dose Lo T + 1 U. A.	+1 anatoxine (12 unités)	Cobaye mort en 36 h.
	+1/10 anatoxine (12 unités)	Cobaye mort en 2 j.
	+1/30 anatoxine (12 unités)	Cobaye survit au delà de 6 j.
1 dose Lo T + 1 U. A.	+1 anatoxine chauffée 10 min. à 100° .	Cobaye mort en 2 j. 1/2.
	+1/3 anatoxine chauffée 10 min. à 100° .	Cobaye mort en 5 j.
	+1/10 anatoxine chauffée 10 min. à 100° .	Cobaye survit au delà de 6 j.

Le pouvoir immunisant de l'anatoxine récupérée à différentes températures subit des variations parallèles à celles des deux autres propriétés que nous venons d'examiner. L'anatoxine extraite du flocculat, lorsque celui-ci est chauffé à 82°, et même à 100°, possède à quantité d'unités anatoxiques sensi-

(1) G. RAMON, *C. R. Société de Biologie*, 105, 1930, p. 173.

blement équivalente un pouvoir immunisant au moins égal à celui de l'anatoxine dérivant directement de la toxine (1).

Rappelons ici que l'extraction de la toxine permet d'éliminer au moins 97 p. 100 de l'azote total du mélange primitif : bouillon anatoxique + sérum spécifique.

Ainsi, l'anatoxine diphtérique extraite du flocculat spécifique et placée dans les conditions physico-chimiques que nous avons indiquées se montre très résistante vis-à-vis de la chaleur, et relativement plus résistante que l'anatoxine ordinaire contenue dans le bouillon diphtérique. Chauffée à 100°, elle conserve ses propriétés caractéristiques, en particulier son pouvoir immunisant.

Les expériences ici rapportées nous ont permis de montrer une fois de plus que, contrairement à l'opinion de nombre d'auteurs, l'union antigène anticorps est fragile et peut être très facilement rompue ; elles nous permettent de mettre à nouveau en évidence certaines des propriétés essentielles de l'anatoxine qui n'appartiennent qu'à ce dérivé de la toxine.

*
* *

Ainsi tout un ensemble de propriétés : innocuité, résistance particulière à la chaleur, stabilité, irréversibilité, valeur antigène intrinsèque se traduisant par le pouvoir de provoquer la formation abondante d'antitoxine dans l'organisme humain ou animal, pouvoir dissociant... différencient l'anatoxine de tous les antigènes jusqu'ici envisagés, en font une substance nouvelle, lui assurent une existence propre justifiant la dénomination spéciale qui lui a été donnée en 1923, et qu'une expérimentation et une utilisation pratique des plus étendues à l'heure actuelle ont définitivement consacrée.

(1) Des essais actuellement en cours nous feront connaître si l'anatoxine, sous cette forme concentrée et purifiée, peut être utilisée avec quelques avantages dans l'immunisation active vis-à-vis de la diphtérie chez l'homme en particulier.

CONTRIBUTION A LA CHIMIOTHÉRAPIE DU PALUDISME ESSAIS SUR LES CALFATS (1)

par E. FOURNEAU, M. et M^{me} J. TRÉFOUEL, DANIEL BOVET
et M^{lle} G. BENOIT.

La technique à suivre dans les essais de médicaments pose, pour les recherches sur la chimiothérapie du paludisme, un problème important et qui a été résolu de plusieurs manières différentes par les auteurs qui se sont occupés de la question. Si l'on ne tient pas compte des méthodes physico-chimiques et des essais sur des protozoaires libres, toutes les techniques préconisées se rapportent à des essais *in vivo* sur divers hématozoaires des oiseaux : *Plasmodium relictum* du canari, *Proteosoma* (*Plasmodium*) parasites de Padda et de Fringilla, *Hæmoproteus columbæ* et *Hæmoproteus orizivoræ* parasites, l'un du pigeon et l'autre du calfat (*Orizonis orizivora*).

C'est sur la première de ces espèces, le *Plasmodium relictum*, parasite des passereaux qui se laisse inoculer avec une très grande facilité au canari (*Serinus canarius*), qu'ont porté les recherches du plus grand nombre des auteurs. L'emploi des canaris présente cependant de nombreuses difficultés provenant, d'une part, de l'irrégularité des accès provoqués, irrégularité sur laquelle ont insisté tous les auteurs qui ont employé cette méthode et dont nous avons pu, nous-mêmes, nous convaincre, sans compter le nombre de vérifications que l'on est obligé de faire pour confirmer un résultat; d'autre part du danger de contamination des élevages par des infections bactériennes, transmises d'un animal à l'autre au moment de l'impaludation expérimentale et dont la virulence ne tarde pas à s'accroître en raison des réinoculations en séries auxquelles sont soumises les espèces pathogènes : pseudo-tuberculoses, pasteurelloses, etc. Il faut y ajouter les inconvénients prove-

(1) Voir ces *Annales*, 44, mai 1930, p. 503.

nant du prix de revient des expériences, chaque oiseau ne pouvant être utilisé que pour un seul essai.

Travaillant sur l'*Hæmoproteus columbæ*, E. et E. Sargent (1907) ont montré que la quinine n'avait aucune action, A. Godoy et J. G. Lacorte (1928) ont vu par contre que la plasmoquine agissait sur les gamètes et sur les sporozoïtes. L'emploi du pigeon pour des essais thérapeutiques en série, rendu difficile sous le climat parisien par la nécessité où l'on se trouve d'avoir des *Lynchia* pour propager la maladie, ne nous a pas semblé préférable à celui des canaris au point de vue économique.

Enfin l'utilisation de l'*Hæmoproteus orizivoræ* parasite du calfat, *Padda orizivoræ*, a fait l'objet d'un article de W. A. Collier et M. Krause (1929) où les auteurs mettent en lumière une méthode pratique pour apprécier la valeur curative des médicaments contre le paludisme. Pour faire momentanément disparaître les parasites du sang des oiseaux, ils ont fait des injections intramusculaires de plasmoquine, cinq jours de suite, avec une dose quotidienne allant de 0 gr. 00003 à 0 gr. 0000075 en solution dans 0 c.c. 3 d'eau. Les auteurs montrent aussi que, chez les témoins non traités, l'infection, chronique et presque constante chez les oiseaux qui sont amenés en Europe, peut varier chez un même oiseau mais ne peut spontanément régresser.

Après quelques tentatives infructueuses, essais de contamination par le *Plasmodium relictum*, d'autres oiseaux plus résistants que les canaris, nous avons fixé notre choix également sur les *Hæmoproteus* parasites du calfat, et cette méthode nous a fourni des résultats très satisfaisants pour le but que nous nous proposons.

I. — *Hæmoproteus orizivoræ*.

C'est à Anschütz (1909) que l'on doit, après Laveran (1900), la description et l'étude de l'hématozoaire que nous avons utilisé dans nos recherches. Cet auteur le trouva dans le sang du calfat (Reisvogel, Reisfinken en allemand) *Orizonis orizivora*, *Spermestes orizivora*, *Padda orizivora*, provenant des rivières de Malaka, des Iles de la Sonde, de Sumatra et de Java.

De même que dans les lots d'oiseaux examinés par Collier et Krause et par nous-mêmes, il observa déjà que la plupart des oiseaux étaient plus ou moins infectés par un protozoaire qu'il nomma *Hæmoproteus orizivoræ* (Anschütz, 1909).

On rencontre dans le sang circulant deux sortes de formes : les progamètes mâles ou microgamétocytes et les progamètes femelles ou macrogamétocytes. Les uns et les autres sont parasites des hématies de l'oiseau, en forme de croissant plus ou moins fermé, avec des extrémités arrondies ou embrassantes; souvent seul le noyau du globule rouge subsiste d'une manière visible. Sur frottis au Giemsa à l'intérieur du parasite on peut reconnaître le noyau, central ou légèrement rejeté sur le côté. Ces deux sortes de gamètes offrent entre elles les différences de coloration et de pigmentation que l'on rencontre chez toutes les espèces du groupe : microgamétocytes bleu clair, à noyau plus riche, en chromatine, à pigment grossièrement réparti, macrogamétocytes au contraire violacés, plus foncés. La division des parasites se fait dans les viscères; on rencontre des formes jeunes et des formes libres dans les poumons, le foie, la rate, plus rarement dans les reins et le cerveau. Anschütz signale, à côté d'une schizogonie typique, deux types de schizogonie régressive provenant de la division des micro- et des macrogamétocytes.

II. — Technique des expériences

Le degré de l'infection varie sur les lames de sang d'oiseau examinées à l'état frais de 1 et même 2 parasites par champ de microscope (ocul. Zeiss 6, obj. immers. homog. 1,5) à 1 parasite pour 100 champs et zéro. Les oiseaux utilisés pour les essais de médicaments sont choisis parmi ceux qui présentent, après avoir été suivis pendant cinq à dix jours, un nombre constant d'hématozoaires (au moins 1 parasite pour 15 champs de microscope). On peut, de la sorte, être certain qu'ils ne redescendraient pas spontanément à 0 pendant le temps que dure l'expérience et que leur « stérilisation » (si elle se produit) est bien le fait du médicament injecté. On convient arbitrairement que les oiseaux chez lesquels aucun parasite n'a pu être mis en

évidence après l'examen attentif de 100 champs sont stérilisés. Des oiseaux non traités ont d'ailleurs été à maintes reprises gardés comme témoin : on s'assure qu'ils présentent bien chaque jour des parasites dans leur sang. De tels oiseaux, comme aussi l'existence d'une dose liminaire propre à chaque médicament (dose au-dessous de laquelle le nombre des parasites n'est plus influencé par le traitement), montrent la relation très étroite qui existe entre le degré d'infection et l'action curative et permettent d'exercer un contrôle constant sur la marche des expériences; ils constituent une vérification permanente des lots d'oiseaux mis en expériences, et, malgré le très grand nombre de mesures que nous avons effectuées (près de 6.000), nous ne nous sommes jamais trouvés en face de contradictions dans les faits observés.

Dans les recherches préliminaires il suffit d'expérimenter avec 1 ou 2 oiseaux pour être certain de l'activité ou de l'inactivité d'un médicament. S'il s'agit de comparer l'action de différents médicaments ou l'action des différentes doses d'un même médicament, il est préférable de traiter simultanément de 3 à 5 oiseaux avec la même solution.

Les médicaments sont administrés soit par voie sous-cutanée, dans un volume de 0 c. c. 5 d'eau distillée, injectés dans l'arête dorsale, à cinq reprises, cinq jours de suite, soit, si le médicament est insoluble, par voie buccale (voir Fourneau et ses collaborateurs, 1930), cinq jours de suite également. La dose dont il sera question dans la suite est la dose quotidienne, et non la dose totale.

Dans la courbe indiquant l'évolution de l'infection à la suite d'un traitement curatif, le nombre des parasites présentés jour après jour par l'oiseau a été exprimé en ordonnée par des coordonnées logarithmiques, le temps étant indiqué en abscisse en coordonnées cartésiennes. Exprimée en coordonnées ordinaires, toute la partie la plus intéressante de la courbe (le passage de l'infection de $1/10$ à $1/100$) disparaîtrait par rapport à l'amplitude de variations plus importantes numériquement (le passage du nombre des parasites de 1 à $1/10$) qui ne paraissent pas traduire une modification essentielle dans le cours de l'infection (voir fig. 2 et 3).

Les résultats présentés par plusieurs oiseaux traités par la

même dose d'un même produit peuvent aussi être réunis en une seule courbe dont l'abscisse indique le temps par rapport au début du traitement, et dont l'ordonnée indique le pour cent des oiseaux « stérilisés » à ce jour. La superposition de plusieurs courbes de ce type permet de comparer entre elles, d'une manière un peu schématique il est vrai, les actions de différentes doses du même médicament ou les actions de différents médicaments (voir fig. 4 et 5). Pour ces comparaisons, de même que pour pouvoir attribuer à chaque produit une sorte de « coefficient chimiothérapeutique » (il ne saurait être question d'établir un coefficient chimiothérapeutique vrai au sens qu'Ehrlich donnait à ce mot puisque d'une part le traitement doit être fractionné pour aboutir et que d'autre part il n'y a jamais de stérilisation vraie), nous avons été conduits à rapporter toujours la dose curative à la dose maxima tolérée. Nous parlerons ainsi de doses journalières égales à la D. M. T./4, D. M. T./10, D. M. T./40, D. M. T./150, D. M. T./300, et ce sont ces doses que nous serons amenés à comparer entre elles quand nous voudrons établir un rapport entre l'activité de deux produits.

Ces comparaisons n'ont évidemment rien d'absolu puisque les rapports entre les toxicités et l'action de deux produits pourront changer lorsque l'on passera de l'oiseau à un autre animal de laboratoire, et de ceux-ci à l'homme : c'est là une difficulté qui se présente chaque fois que l'on fait des mesures sur les animaux en chimie thérapeutique, et elle est inhérente au travail de laboratoire. Mais lorsque les produits essayés appartiennent à la même série chimique, on peut espérer que les rapports de leurs coefficients seront conservés; c'est le cas des médicaments étudiés ici.

La dose mortelle étant la plus petite dose unique déterminant la mort de l'oiseau au plus tard en soixante-douze heures, ce que nous appelons D. M. T. est la dose maxima tolérée, c'est-à-dire la dose immédiatement inférieure à la dose mortelle; elle ne tue donc pas l'oiseau.

III. — Avantages de la méthode. Comparaison avec la méthode classique.

On voit donc que cette technique d'essais évite plusieurs des inconvénients que présentait l'étude des canaris :

1° Les infections sont plus régulières (pas de guérisons spontanées observées), et l'action d'un médicament peut être décelée à coup sûr au moyen d'un nombre restreint d'oiseaux. La comparaison entre plusieurs médicaments difficile à faire au moyen de la technique classique des essais se fait au contraire ici d'une manière précise;

2° Les oiseaux étant normalement infectés à leur entrée au laboratoire on évite l'un des risques les plus importants d'infection bactérienne dans les élevages, les transfusions de sang d'un animal à un autre étant devenues superflues;

3° Enfin, au point de vue économique, la méthode que nous avons employée ici présente un réel avantage : prix moins élevé des oiseaux, essais portant sur un nombre d'animaux plus restreint, et surtout possibilité d'utiliser chaque oiseau successivement pour plusieurs essais sans que la réaction se trouve sensiblement modifiée par les traitements antérieurs qu'il a subis, à condition d'espacer suffisamment les expériences.

IV. — Valeur et discussion de la méthode.

La véritable valeur d'une méthode d'essais de médicament réside en ce fait que l'on doit pouvoir retrouver identiques à eux-mêmes chez l'homme les résultats qui ont été mis en évidence chez l'animal : en ce sens c'est donc aux résultats cliniques qu'il faudra se reporter pour juger de l'opportunité de nos expériences sur le calfat et pour apprécier le critère dont nous nous sommes servis. Les médicaments qui agissent sur les *Plasmodium* du paludisme humain et que nous avons essayés sur les *Hæmoproteus* du calfat au début de nos recherches sont au nombre de quatre : la quinine et ses dérivés, la plasmochine, le bleu de méthylène et le quinio-stovarsol. De ces

quatre produits les trois derniers agissent aussi sur l'infection expérimentale de l'oiseau.

En ce qui concerne l'inactivité de la quinine sur les *Hæmoproteus* de calfat, quelques remarques s'imposent. Tout d'abord, si l'on compare entre elles l'infection chronique du calfat et l'infection momentanée aiguë du canari, on constate que la quinine agit sur cette dernière non pas en stérilisant l'oiseau, mais en retardant ou en diminuant l'accès; dans les expériences rapportées par Fourneau et ses collaborateurs (1930) sur huit oiseaux traités curativement par de fortes doses, nous relevons un seul cas où l'oiseau traité soit redescendu à 0 le troisième jour, tous les autres animaux ayant présenté des parasites pendant neuf, quinze et vingt jours, c'est-à-dire pendant un temps égal à la durée de l'infection que présentent les témoins. Marks (1944), travaillant aussi sur une souche de *Plasmodium*, n'a pas pu mettre en évidence une action de la quinine sur l'infection.

L'absence d'action de la quinine sur le parasite du calfat peut être attribuée également au fait que les oiseaux que nous traitons sont à l'état d'infection chronique, elle est aussi en partie inhérente à tous les parasites aviaires : il est possible enfin qu'on puisse l'attribuer à ce que, dans le genre *Hæmoproteus*, seuls les gamètes circulent dans le sang périphérique, alors que l'action de la quinine ne s'exerce au contraire que sur les formes végétatives, schizontes et mérozoïtes.

Le fait que le quinio-stovarsol a une très légère action sur l'infection du calfat montre que le chimisme des *Hæmoproteus* est voisin de celui des *Plasmodium*.

La comparaison des doses actives et des coefficients chimiothérapeutiques obtenus dans notre laboratoire pour la plasmochine et le bleu de méthylène avec les deux méthodes, celle utilisant les parasites du canari et celle utilisant les *Hæmoproteus* du calfat, montrera l'analogie des chiffres obtenus, et le parallélisme des résultats.

	<i>Plasmodium</i> (canari)	<i>Hæmoproteus</i> (calfat)
	<hr/>	<hr/>
Plasmoquine.	D. M. T. : 0,00025..	D. M. T. : 0,00016..
	D. min. act. : 0,000004.	D. min. act. : 0,000004..
Bleu de méthylène. . . .	D. M. T. : 0,0015..	D. M. T. : 0,004.
	D. min. act. : 0,00025.	D. min. act. : 0,0004.

De nombreux auteurs, Rœhl (1926), Muhlen (1926), Eichholz (1927), Schulemann et Memmi (1927), Van den Branden et Henry (1927), ont montré que l'action de la plasmoquine s'exerçait de préférence et le plus rapidement sur les gamètes ; il est assez probable que les résultats très nets et très rapides que nous avons trouvés en faisant agir des produits dérivant de la série de la quinoïdine sur les *Hæmoproteus*, dont seules les formes sexuées circulent dans le sang périphérique, soient imputables à ce fait.

V. — Évolution clinique de l'infection à la suite du traitement.

Le traitement étant constitué par une série de cinq injections effectuées pendant cinq jours consécutifs, l'effet des médicaments actifs administrés à haute dose se manifeste au plus tôt le troisième jour, c'est-à-dire à la suite de la seconde injection : le sang de l'oiseau est alors débarrassé de parasites ; dans d'autres cas, l'action parasiticide est plus lente et plus progressive, et le nombre des parasites s'abaisse progressivement de $1/2$ à $1/10$, puis à $1/30$, $1/50$ pour n'arriver à 0 qu'en quatre ou cinq jours. L'action des faibles doses est naturellement plus lente, il peut arriver que l'oiseau n'arrive à être débarrassé de ses hématozoaires que trois jours après la fin du traitement, le huitième jour ; la guérison est alors de courte durée et la rechute survient après un ou deux jours, très brutale, l'infection se présentant très rapidement avec le même degré d'acuité qu'avant le début de la médication. La rapidité avec laquelle se produit la première rechute, qui peut survenir au bout d'un jour avec une médication insuffisante dans les conditions de posologie et par les voies d'introduction que nous avons utilisées ou plus de un mois après, et l'allure de l'infection à la suite de cette rechute (les parasites peuvent revenir très rapidement au nombre qu'ils atteignaient au début, ou au contraire peuvent disparaître de nouveau pour un temps plus ou moins long), sont encore deux autres signes qui permettent d'apprécier l'intensité et la valeur de l'action curative d'un traitement. Plus que de longues explications, les graphiques qui figurent ici permet-

tront de se rendre compte de la valeur de ces différents critères et de la remarquable corrélation qui existe entre les résultats auxquels ils conduisent. Notons seulement deux faits encore : le premier, c'est que l'action des très fortes doses se montre souvent inférieure à celle de doses légèrement plus petites ; il faut attribuer ce fait à la toxicité du produit qui, en affaiblissant l'oiseau, diminue la résistance propre que celui-ci est susceptible de présenter à l'infection. Un second fait remarquable, c'est la sorte d'affolement du nombre des parasites, les fluctuations considérables dans les deux sens de ce nombre chez des oiseaux qui ont été traités par de très petites doses d'un médicament actif : on croirait assister à la phase critique d'une lutte intense que se déclareraient l'organisme et les hématozoaires.

VI. — Action des médicaments sur la morphologie des parasites.

Il est encore un autre critère qui permet de reconnaître l'action des médicaments sur l'infection à *Hæmoproteus*, c'est la morphologie particulière que revêtent les parasites à la suite d'un traitement curatif. Comme l'avait déjà observé Anschütz, et comme nous l'avons déjà fait remarquer, l'on ne rencontre dans le sang périphérique d'un animal normal que des gamétocytes adultes de grande taille, occupant la plus grande partie déjà du volume des hématies qu'ils parasitent. C'est en vain que l'on chercherait à mettre en évidence au cours de l'infection normale des « mises en circulations » périodiques de formes plus jeunes comme c'est le cas dans les infections à *Plasmodium* humaines (cycles schizogoniques correspondant aux accès de fièvre) ou aviaires [Taliaferro (1925), Drensky et Hegner (1926), Bovet (1930)], la taille moyenne restant toujours identique à elle-même, même dans les cas d'infections légères où les parasites disparaissent et réapparaissent spontanément dans le sang.

Or, au cours du traitement, on voit les deuxième, troisième et quatrième jours de celui-ci apparaître, en proportion de plus en plus grande, à côté des formes adultes habituelles, des formes annulaires de très petites tailles qui font penser aux

petites formes altérées signalées par Rœhl (1926), dans ses recherches sur la plasmochine. Toutefois, ce ne sont pas des parasites dégénérés, puisque ce sont eux que l'on voit apparaître uniquement au début des rechutes. Par la suite, on

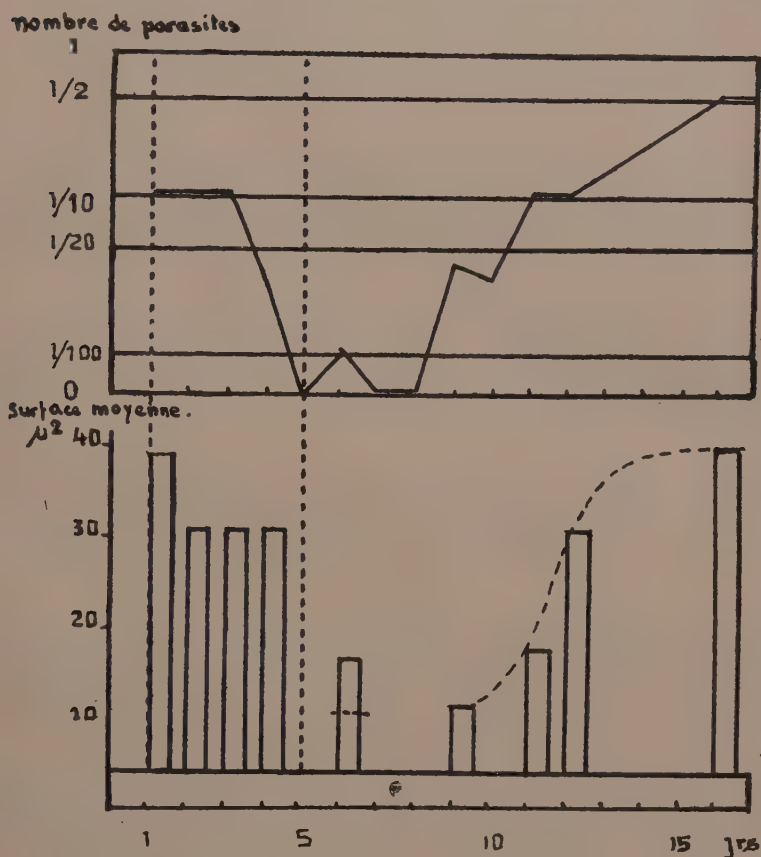


FIG. 1. — Action de la Plasmoquine sur la morphologie des *Hæmoproteus*.
 En haut : nombre des parasites; traitement par la plasmoquine, à la dose de 0 gr. 000001 par jour, cinq jours de suite.
 En bas : surface moyenne des parasites pendant la même période.

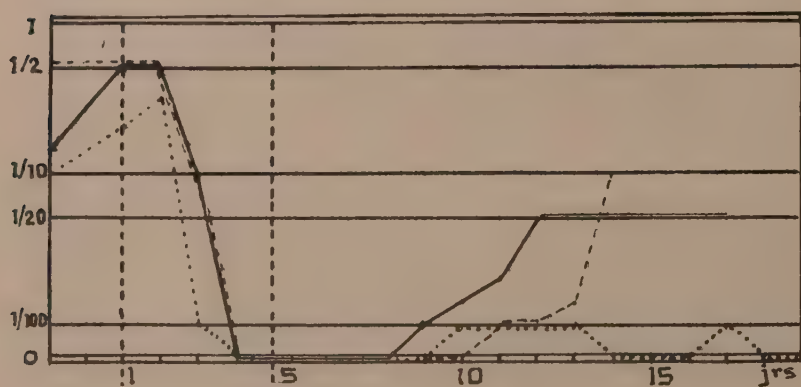
assiste à leur croissance : la taille moyenne des parasites (en μ^2) passe, jour après jour, par exemple, de 60 à 100, à 200, à 350 pour atteindre, le cinquième jour après le début de la rechute, la taille normale de 450 (fig. 1).

On ne peut faire encore que des hypothèses sur le mécanisme

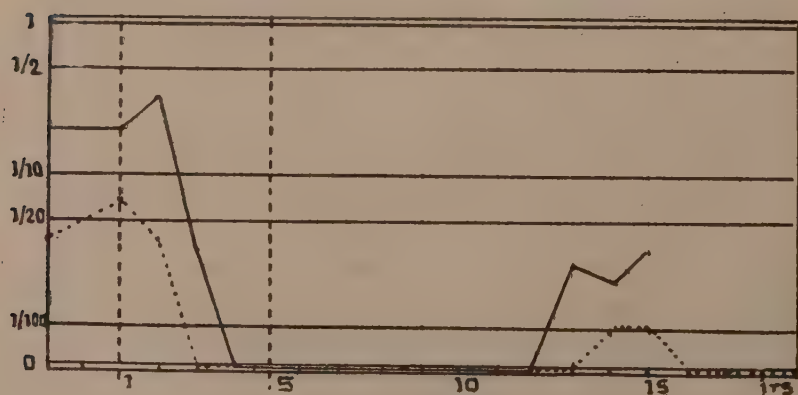
qui amène ainsi dans la circulation périphérique des formes jeunes qui normalement seraient restées dans les tissus du foie, du poumon et de la rate.

VII. — Résultats sur une série de médicaments dérivant de la quinoléine.

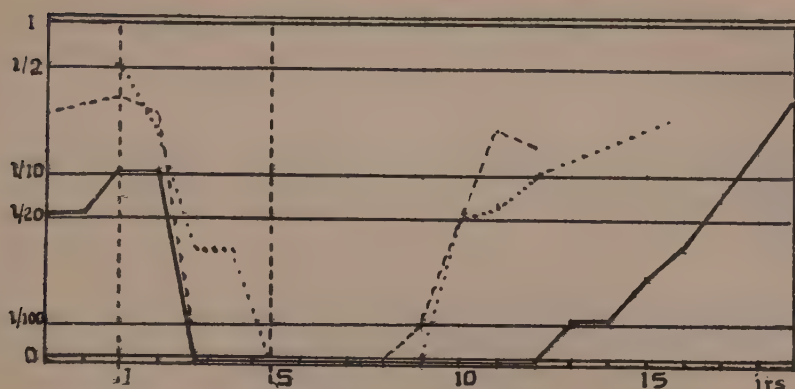
Comme nous avons surtout pour but la substitution du calfat au canari (pour les raisons exposées plus haut), nous avons pensé qu'il était préférable de s'adresser tout d'abord à des substances sûrement efficaces. La quinine ayant été reconnue inactive sur le calfat et ne se prêtant pas à des



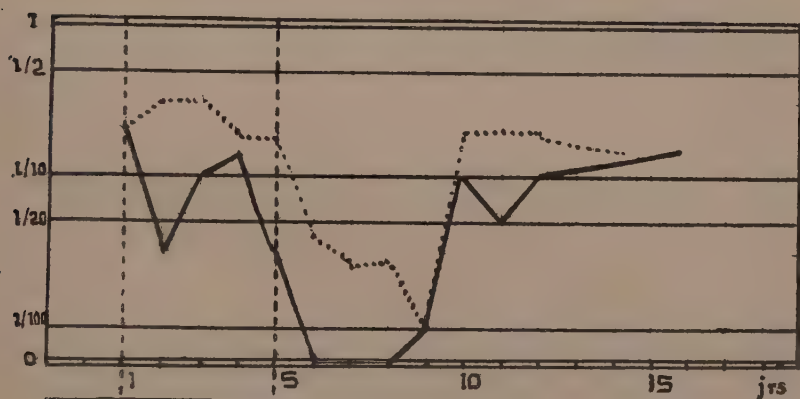
{Produit 710 : D. M. T./4, 0 gr. 00015.



D. M. T./10, 0 gr. 00006.



D. M. T./40, 0 gr. 000015.

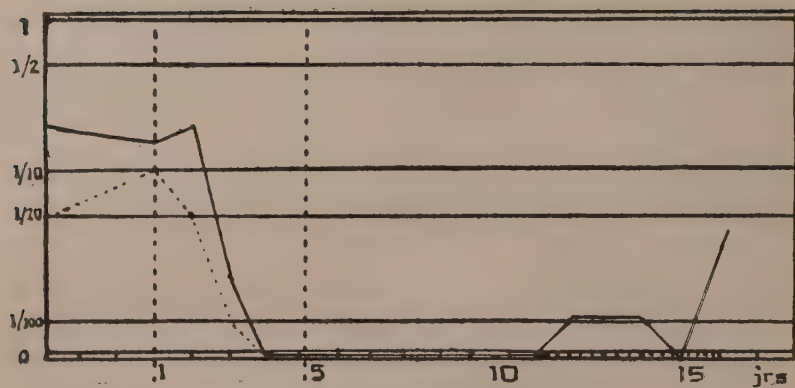


D. M. T./150, 0 gr. 000004.

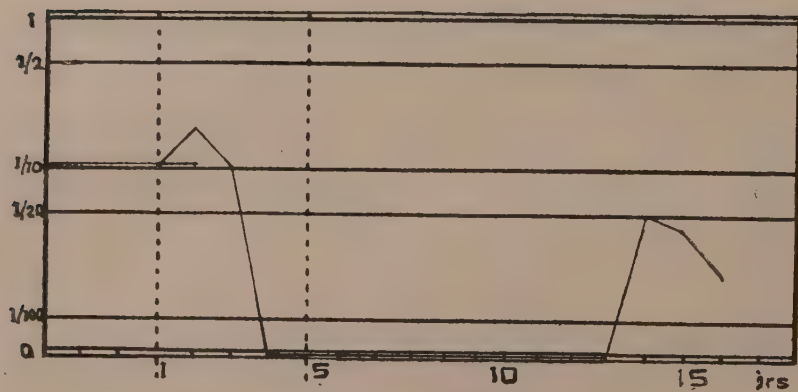
FIG. 2. — Action du produit 740 sur l'évolution de l'infection chronique de calfat par *Hæmoproteus orizivore*.

Dans ce schéma et dans le suivant, on a figuré en abscisse le nombre des parasites présents dans le sang périphérique de chaque oiseau (coordonnées logarithmiques), et en ordonnées le temps en jours. Les deux lignes pointillées verticales correspondent au début et à la fin du traitement qui dure du premier au cinquième jour. Chaque courbe correspond à un oiseau distinct, deux ou trois oiseaux ayant chaque fois été traités par la même dose du produit expérimenté. Les doses indiquées sous chaque graphique sont les doses quotidiennes, administrées à 5 reprises, cinq jours de suite, rapportées à la dose maxima tolérée d'une part et indiquées en poids d'autre part.

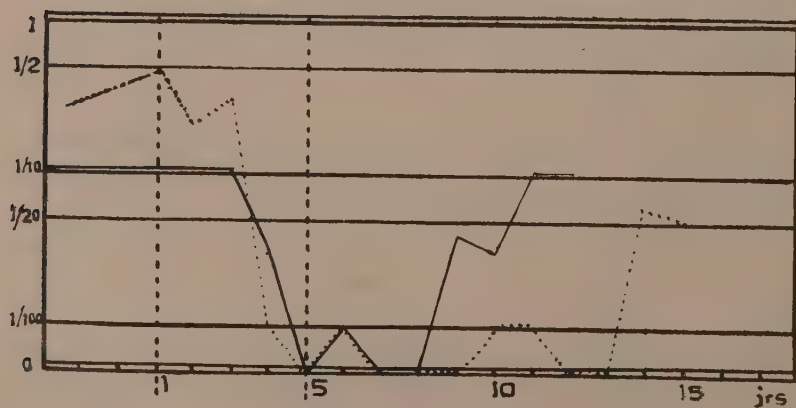
essais de chimiothérapie méthodiques, nous avons entrepris des recherches sur une série de dérivés quinoléiniques [préparés par nous pour en étudier la valeur anesthésique (1)]



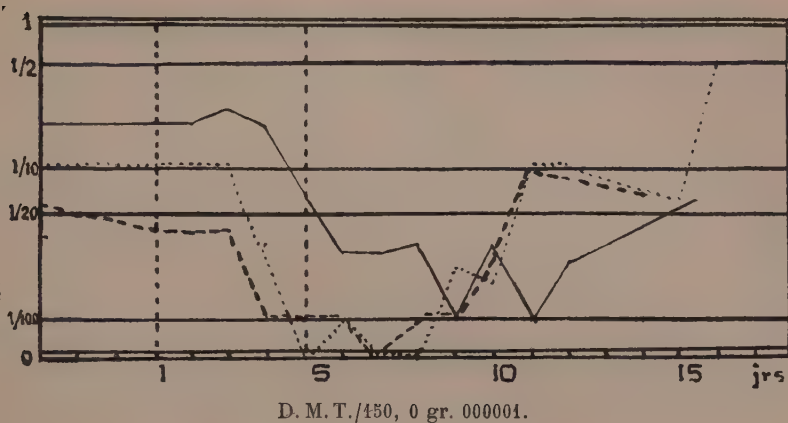
Plasmoquine : D. M. T./4, 0 gr. 00004.



D. M. T./10, 0 gr. 000016.



D. M. T./40, 0 gr. 000004.

FIG. 3. — *Action de la Plasmoquine.*

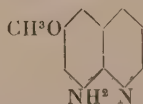
à laquelle appartient ce médicament si actif sur les hématozoaires de l'homme, la Plasmoquine, aboutissant des belles recherches faites dans les laboratoires de l'I. G. par Schulemann, Mietsch et Schondorfer; malheureusement ces auteurs n'ont pas encore donné de renseignements thérapeutiques sur les nombreux corps essayés.

Nous n'avons pas rencontré de substances plus actives que la Plasmoquine aux mêmes doses, sauf une, qui agit encore à la dose de 0 gr. 000003 et qui fera l'objet d'une note prochaine. Mais il semble néanmoins que le 710 pourrait être substitué à la Plasmoquine parce qu'il est moins toxique, que l'écart entre la dose active et la dose tolérée est sensiblement le même (au 150^e de la dose tolérée on observe une action), qu'il offre une plus grande marge de sécurité, et qu'enfin il pourrait sans doute être obtenu à un prix beaucoup moins élevé.

(1) Nous avons observé que la Plasmoquine était douée de propriétés anesthésiques très accentuées et c'est la principale raison pour laquelle nous avons porté nos recherches dans cette série. La substance portant le n° 665 est de vingt à cent fois plus active que la cocaïne sur la cornée du lapin; son action anesthésique sur la langue se prolonge pendant un temps très long; elle est tout à fait comparable à la percaïne à ce point de vue. Des essais physiologiques et cliniques sont en cours sur cette substance et les résultats en seront publiés ultérieurement.

Aminométhoxyquinoléines sans substitution à l'azote.

(587)

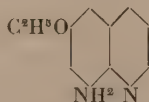


D. M. T., 0,004; *action*, *D. M. T.*/4 : 0,001 \pm (1/3); poids moléculaire, 172.

D. M. T./n = le n^{ième} de la dose maxima tolérée. Le signe + indique une action certaine (suivi de la moyenne de jours \pm 0). Le signe — indique une action nulle. Le \pm indique une action irrégulière. La fraction entre parenthèses est le rapport entre le nombre d'oiseaux améliorés et le nombre total d'oiseaux traités. Si les doses sont comptées en poids de base libre les substances ont toujours été administrées sous forme de chlorhydrate.

Aminoéthoxyquinoléine.

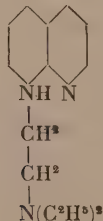
(600)



D. M. T., 0,0025; *action*, *D. M. T.*/4 : 0,0006 —; poids moléculaire, 186.

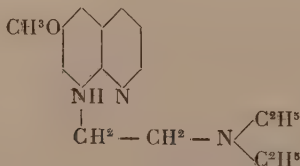
Chaîne à 2 atomes de C.

(731)

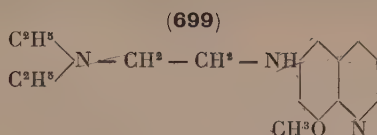


D. M. T., 0,0016; *action*, *D. M. T.*/4 : 0,0004 \pm (1/3); poids moléculaire, 237.

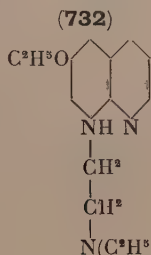
(692)



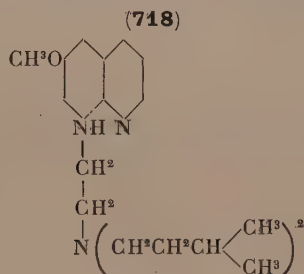
D. M. T., 0,0016; *action*, *D. M. T.*/4 : 0,0004 + (8 jours); *D. M. T.*/10 : 0,00016 + (5 jours); *D. M. T.*/40 : 0,00004 + (3 jours); *D. M. T.*/150 : 0,00001 —; Poids moléculaire, 274.



D.M.T., 0,003; *action*, *D.M.T.*/4 : 0,00075 —; poids moléculaire, 271.



D.M.T., 0,0005; *action*, *D.M.T.*/4 : 0,000125 + (3 jours);
D.M.T./10 : 0,00005 ± (1/2); poids moléculaire, 285.



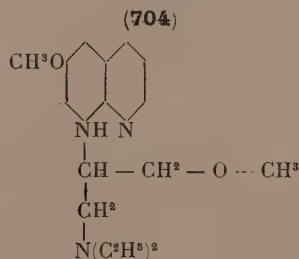
D.M.T., 0,0003; *action*, *D.M.T.*/4 : 0,0002 + (1 jour);
D.M.T./10 : 0,00008 —; poids moléculaire, 374.

SUBSTITUTION SUR C-1.

Alcoyloxydialcoylamino-chloropropanes
 sur base 6-alcoyloxy-8-aminoquinoléine.

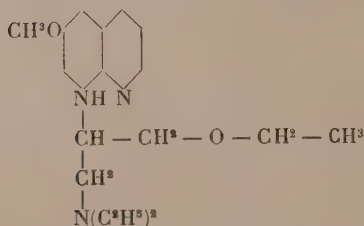
A. — Base méthoxy.

1° Diéthylamino :



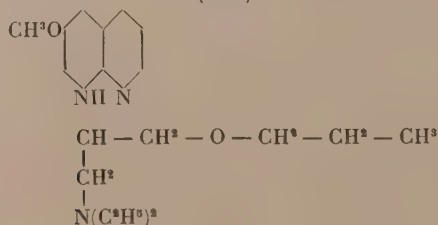
D.M.T., 0,001; *action*, *D.M.T.*/4 : 0,00025 + (3 jours); *D.M.T.*/10 : 0,0001
 + (2 jours); *D.M.T.*/40 : 0,000025 ± (2/3); poids moléculaire : 316.

(703)



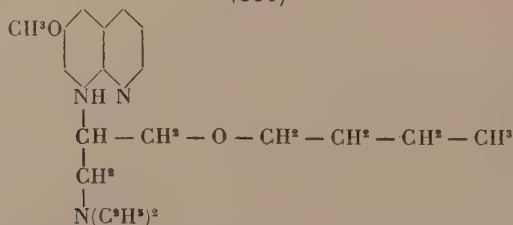
D.M.T., 0,0006; *action*, *D.M.T.*/4 : 0,00015 + (3 jours); *D.M.T.*/10 : 0,00006 + (3 jours); *D.M.T.*/40 : 0,000015 —; poids moléculaire, 329.

(706)



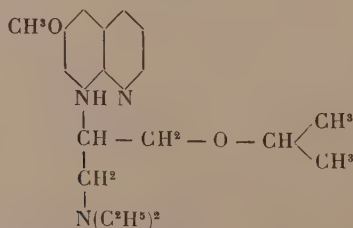
D.M.T., 0,0008; *action*, *D.M.T.*/4 : 0,0002 + (4 jours); *D.M.T.*/10 : 0,00008 + (3, 5 jours); *D.M.T.*/40 : 0,00002 —; poids moléculaire, 343.

(697)



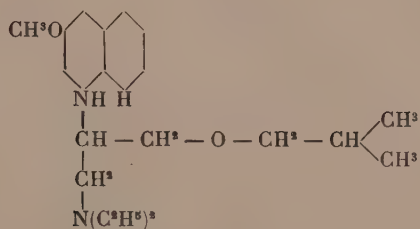
D.M.T., 0,0008; *action*, *D.M.T.*/4 : 0,0002 + (2 jours); *D.M.T.*/10 : 0,00008 + (2 jours); *D.M.T.*/40 : 0,00002 —; poids moléculaire, 358.

(708)



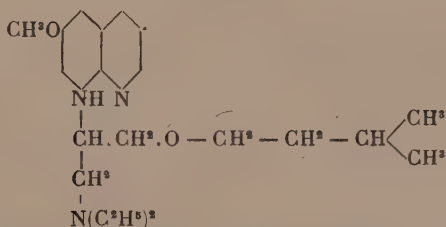
D.M.T., 0,0004; *action*, *D.M.T.*/4 : 0,0001 ± (3/4); *D.M.T.*/10 : 0,00004 —; poids moléculaire, 343.

(705)



D.M.T., 0,0004; *action*, *D.M.T./4* : 0,0001 —; poids moléculaire, 358.

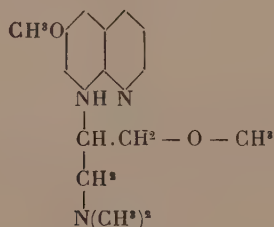
(707)



D.M.T., 0,0008; *action*, *D.M.T./4* : 0,0002 —; poids moléculaire, 371.

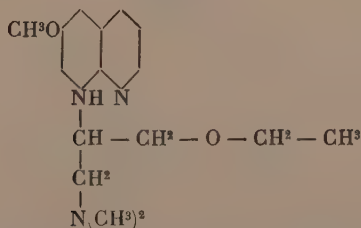
2° Diméthylamino :

(711)



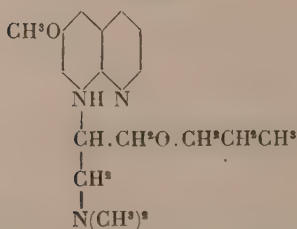
D.M.T., 0,0068; *action*, *D.M.T./4* : 0,0002 \pm (2/3); poids moléculaire, 287,5.

(709)



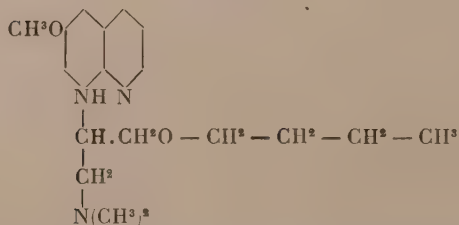
D.M.T., 0,001; *action*, *D.M.T./4* : 0,00025 + (4 jours);
D.M.T./10 : 0,0001 \pm (1/2); poids moléculaire, 305.

(712)



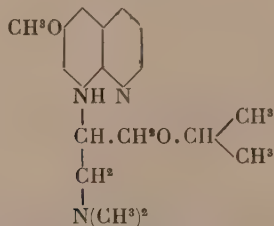
D.M.T., 0,001; *action*, *D.M.T.*/4 : 0,00025 \pm (2/3); *D.M.T.*/10 : 0,0001 \pm (1/3);
poids moléculaire, 315.

(714)



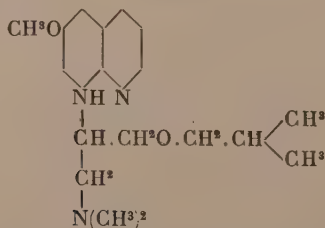
D.M.T., 0,0012; *action*, *D.M.T.*/4 : 0,0003 + (3 jours);
D.M.T./10 : 0,00012 \pm (1/2); poids moléculaire, 329.

(715)



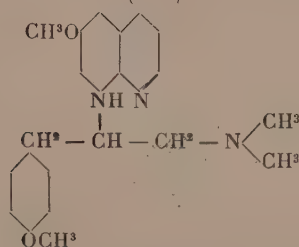
D.M.T., 0,0012; *action*, *D.M.T.*/4 : 0,0003 \pm (1/2); poids moléculaire, 315.

(713)



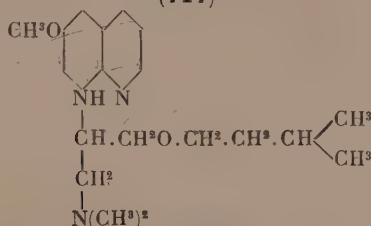
D.M.T., 0,0008; *action*, *D.M.T.*/4 : 0,0002 + (3 jours);
D.M.T./10 : 0,00008 -; poids moléculaire, 323.

(691)



D.M.T., 0,0008; *action*, *D.M.T.*/4 : 0,0002 + (10 jours); *D.M.T.*/10 : 0,00008 + (4 jours); *D.M.T.*/40 : 0,00002 —; poids moléculaire : 327.

(717)

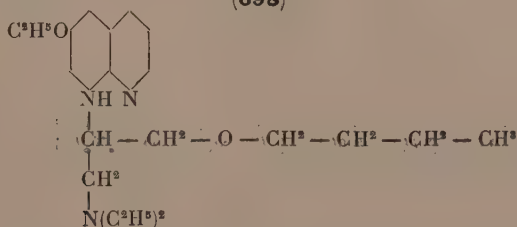


D.M.T., 0,0016; *action*, *D.M.T.*/4 : 0,0004 ± (2/3); *D.M.T.*/10 : 0,00016 —; poids moléculaire, 343.

B. — Base éthyxy.

Diéthylamino :

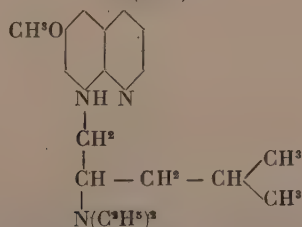
(698)



D.M.T., 0,0003; *action*, *D.M.T.*/4 : 0,000075 —; poids moléculaire, 371.

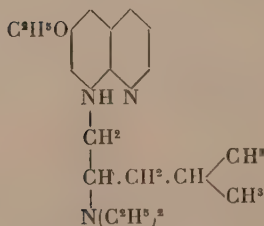
SUBSTITUTION SUR C-2.

(693)



D.M.T., 0,0006; *action*, *D.M.T.*/4 : 0,00015 + (5 jours); *D.M.T.*/10 : 0 00006 ± (1/2); *D.M.T.*/40 : 0,000015 —; poids moléculaire, 327.

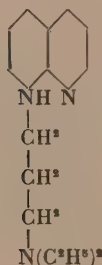
(733)



D. M. T., 0,0002; *action*, *D. M. T.*/4 : 0,00005 ± (1/2); poids moléculaire, 341.

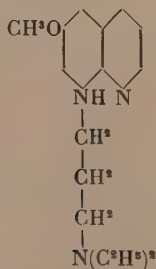
[Chaîne à 3 atomes de C.]

(728)



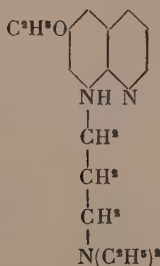
D. M. T., 0,0008; *action*, *D. M. T.*/4 : 0,0002 + (7 jours); *D. M. T.*/10 : 0,00008 + (5 jours); *D. M. T.*/40 : 0,00002 + (5 jours); *D. M. T.*/150 : 0,0000053 — ±; poids moléculaire, 252.

(740)



D. M. T., 0,0006; *action*, *D. M. T.*/4 : 0,00015 + (6 jours); *D. M. T.*/10 : 0,00006 + (10 jours); *D. M. T.*/40 : 0,000015 + (7 jours); *D. M. T.*/150 : 0,000004 ± (1/2); poids moléculaire : 286.

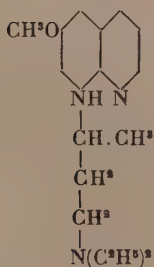
(730)



D.M.T., 0,00006; *action*, *D.M.T.*/4 : 0,000015 + (2 jours);
D.M.T./10 : 0,000006 ± (1/2); poids moléculaire, 300.

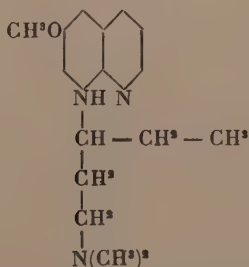
SUBSTITUTION SUR C-1.

(736)



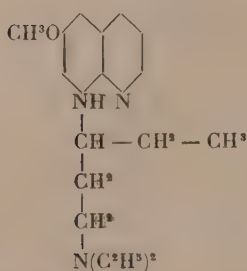
D.M.T., 0,00016; *action*, *D.T.M.*/4 : 0,00004 + (10 jours);
D.T.M./10 : 0,000016 + (6 jours); *D.M.T.*/40 : 0,000004 —; poids moléculaire, 299.

(695)



D.M.T., 0,0008; *action*, *D.M.T.*/4 : 0,0002 + (11 jours); *D.M.T.*/10 : 0,00008 + (8 jours); *D.M.T.*/40 : 0,00002 + (2, 5 jours); *D.M.T.*/150 : 0,0000053 —; poids moléculaire, 282.

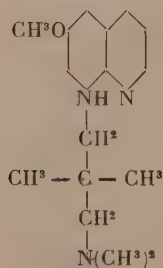
(696)



D.M.T., 0,00008; *action*, *D.M.T.*/ $\frac{1}{4}$: 0,00002 + (5 jours);
D.M.T./ $\frac{1}{10}$: 0,000008 —; poids moléculaire, 310.

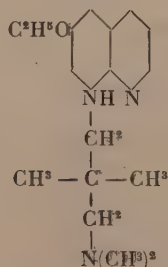
SUBSTITUTION SUR C-2.

(716)



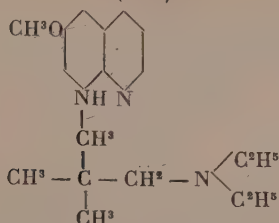
D.M.T., 0,0012; *action*, *D.M.F.*/ $\frac{1}{4}$: 0,0003 + (4 jours); *D.M.T.*/ $\frac{1}{10}$: 0,00012 + (6 jours); *D.M.T.*/ $\frac{1}{40}$: 0,00003 + (4 jours); *D.M.T.*/ $\frac{1}{150}$: 0,000008 —; poids moléculaire, 286.

(734)



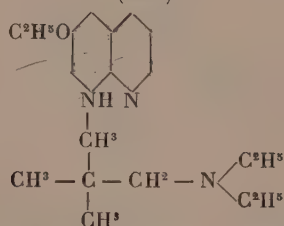
D.M.T., 0,0006; *action*, *D.M.T.*/ $\frac{1}{4}$: 0,00015 + (6 jours); *D.M.T.*/ $\frac{1}{10}$: 0,00006 + (6 jours); *D.M.T.*/ $\frac{1}{40}$: 0,000015 + (4 jours); *D.M.T.*/ $\frac{1}{150}$: 0,000004 —; poids moléculaire, 300.

(664)



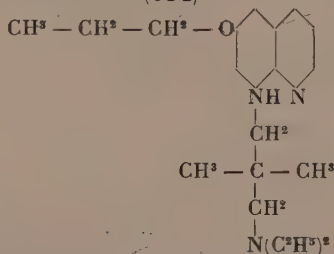
D.M.T., 0,0008; *action*, *D.M.T.*/4 : 0,0002 + (9 jours); *D.M.T.*/10 : 0,00008 + (5 jours); *D.M.T.*/40 : 0,00002 + (2 jours); *D.M.T.*/150 : 0,0000053 —; poids moléculaire, 313.

(665)



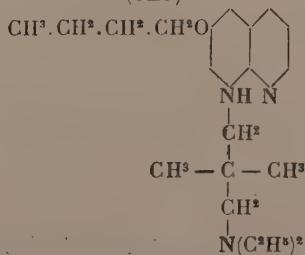
D.M.T., 0,0006; *action*, *D.M.T.*/4 : 0,00015 + (6 jours); *D.M.T.*/10 : 0,00006 + (6 jours); *D.M.T.*/40 : 0,000015 —; poids moléculaire, 327.

(694)



D.M.T., 0,0006; *action*, *D.M.T.*/4 : 0,00015 + (5 jours); *D.M.T.*/10 : 0,00006 + (5 jours); *D.M.T.*/40 : 0,000015 —; poids moléculaire, 341.

(723)



D.M.T., 0,001; *action*, *D.M.T.*/4 : 0,00025 + (5 jours); *D.M.T.*/10 : 0,0001 + (3 jours); *D.M.T.*/40 : 0,000025 ± (1/2); poids moléculaire, 357.

VIII. — Relations entre la constitution chimique
des corps étudiés
et leur action thérapeutique dans le paludisme.

Des résultats précédemment exposés se dégagent les premières conclusions générales suivantes :

1° Le groupe methoxy en position 6 sur le noyau quinoléi-

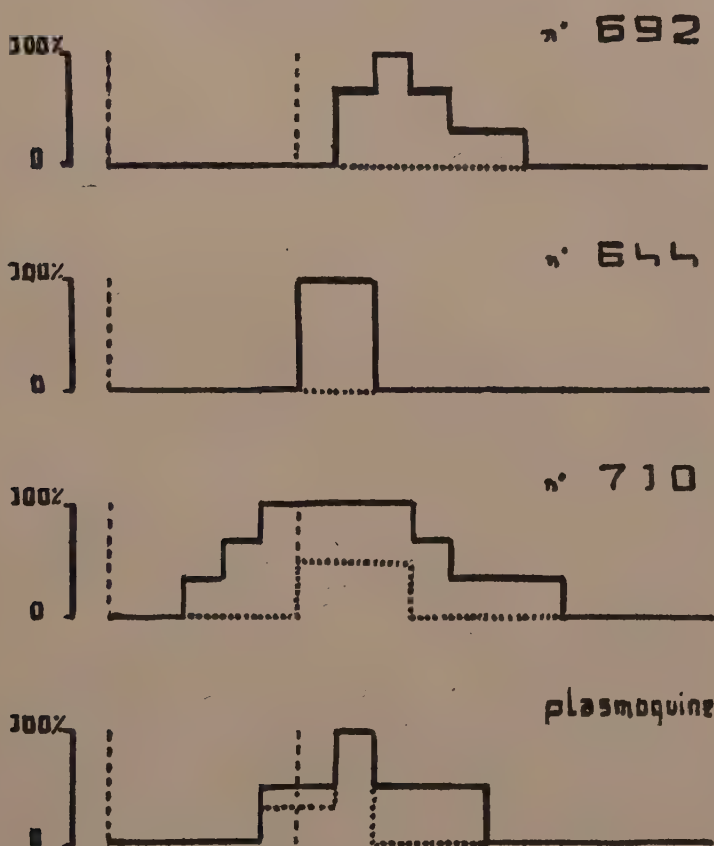


FIG. 4. — Action comparée de différents produits actifs sur des oiseaux traités chaque jour, cinq jours de suite par le $1/40^e$ de la dose maxima tolérée (traits pleins) et par le $1/150^e$ de cette dose (traits pointillés). En abscisse, le temps en jours; en ordonnée, le pourcentage quotidien des oiseaux traités ne présentant plus de parasites dans le sang périphérique.

nique ne paraît pas indispensable; par exemple, le 728 agit à 1/40 de la dose maxima tolérée. La longueur de la chaîne qui sépare les deux azotes intervient.

La substitution à $-\text{OCH}_3$ de $-\text{OC}_2\text{H}_5$ paraît toujours

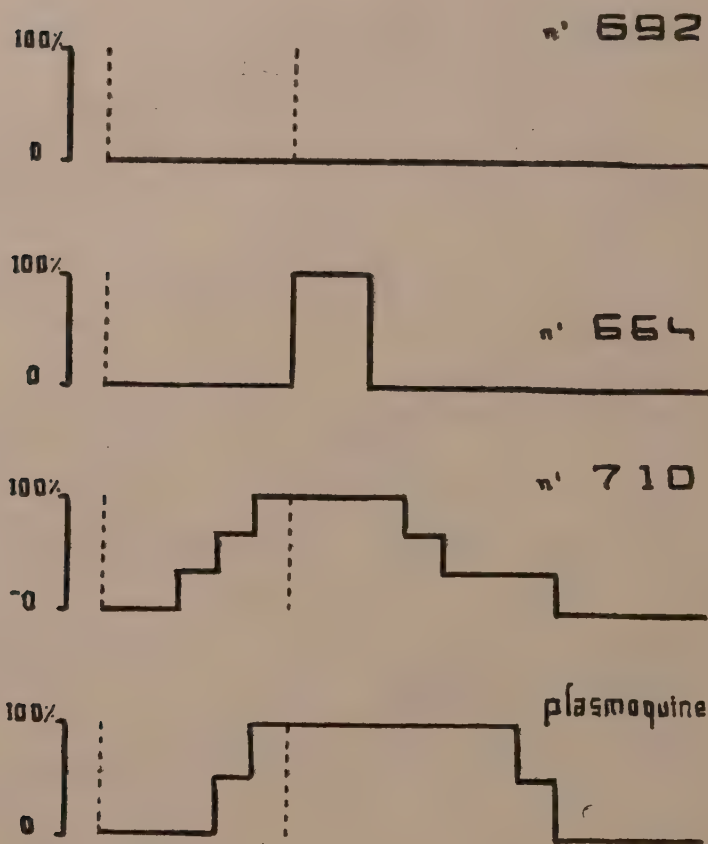
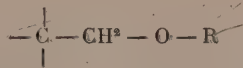


FIG. 5. — Action comparée de différents produits actifs traités par une même dose journalière de 0 gr. 000.502 en injections sous-cutanée

défavorable au point de vue de la médication paludique.

2° Dans le cas du 695 et du 696, le simple remplacement de la fonction diméthylamine par une fonction diéthylamine diminue de dix fois la toxicité, ce qui ne s'est pas vérifié, au moins dans cette proportion, pour d'autres corps.

3° Influence de la fonction éther oxyde :



Une fonction éther-oxyde, placée sur la chaîne diaminée, a une action nettement défavorable.

DE LA VACCINATION ANTIDIPHTÉRIQUE PAR LA VOIE CUTANÉE

par A. BESREDKA.

Il y a dix ans, nous fîmes paraître (1) une étude consacrée à la cuti-infection, à la cuti-vaccination et à la cuti-immunité dans le charbon. Cette étude est devenue le point de départ d'un nombre considérable de publications sur la vaccination et la vaccinothérapie locales dans différentes maladies microbiennes (2).

L'affinité du virus diphtérique pour la peau et les muqueuses, rappelant celle que possède pour les mêmes tissus la bactérie, nous incita, déjà à l'époque, à appliquer le principe de la cuti-vaccination à la diphtérie. Or, des faits imprévus que nous exposerons plus loin et des difficultés d'ordre technique ont retardé la mise au point des présentes recherches.

Nous laisserons ici de côté les problèmes relatifs au mécanisme de la cuti-vaccination antidiphtérique pour n'exposer que les faits tels qu'ils se sont présentés à nous au cours de ces expériences. Nous allons les examiner dans l'ordre suivant :

A. La réceptivité de la peau du lapin à la toxine diphtérique.

B. L'immunité antidiphtérique locale par simple friction, ou l'immunité non spécifique.

C. L'immunité antidiphtérique locale spécifique.

D. L'immunité antidiphtérique générale.

Avant d'exposer les expériences sur le lapin, nous allons résumer brièvement les recherches faites sur le cobaye.

*
* *

Le cobaye étant considéré à juste titre comme l'animal de choix pour l'étude de la diphtérie, c'est sur lui que portèrent jus-

(1) *Ces Annales*, 1921, p. 421.

(2) Voir *Antivirusthérapie*, Masson et C^{ie}, éditeurs, 1930.

qu'à présent les essais de vaccination par la voie cutanée. Sans entrer dans les détails, disons que nos tentatives personnelles et celles de nos collaborateurs pour obtenir chez cet animal l'immunité par frictions ou par pansements ont à peu près complètement échoué. Nous avons eu beau appliquer la toxine diphtérique sur la peau rasée ou scarifiée, employer des toxines chauffées à diverses températures, faire varier les doses et les intervalles, les résultats furent toujours médiocres, pour ne pas dire nuls. Notre collaborateur Denis Szüle reprit plus tard ces expériences, en remplaçant la toxine liquide par celle incorporée dans un mélange de lanoline et de vaseline. Il ne fut pas plus heureux que nous : ses cobayes accusaient, à l'expérience d'épreuve, une réaction de Schick positive; leur sérum était dépourvu de tout pouvoir spécifique et à l'injection de la dose simplement mortelle les cobayes préparés succombaient dans le même délai que les témoins. Szüle en conclut que la voie cutanée ne se prête point à la vaccination antidiphtérique (1). Cette conclusion se trouve cependant en désaccord avec les expériences de Baar et Grabenhofer, entreprises ultérieurement avec la pommade-vaccin de Löwenstein.

Partant de l'idée que seules les infections telles que la variole, la rougeole ou le typhus, se traduisant par des manifestations cutanées, confèrent une immunité solide, Löwenstein proposa de recourir à la voie cutanée pour vacciner contre la diphtérie. Il employa à cet effet des cultures de bacilles diphtériques entières, non filtrées, tuées par le formol et incorporées dans un liquide visqueux semi-transparent. Les cobayes frictionnés plusieurs fois avec cette pommade sont vaccinés, d'après ce savant, contre cinq doses mortelles de toxine diphtérique. Löwenstein, ainsi qu'un grand nombre de cliniciens après lui, ont appliqué, on le sait, ce produit avec succès chez l'homme.

Ce qui nous intéresse ici, c'est la partie expérimentale et à cet égard les recherches de Baar et Grabenhofer offrent pour nous un intérêt tout particulier. Ces auteurs ont opéré sur des cobayes; voici à peu près textuellement ce que nous trouvons dans leur mémoire. Les cobayes ayant subi 8 frictions successives avec de la pommade de Löwenstein acquièrent l'immu-

(1) *C. R. Soc. Biol.*, 18 juin 1927, p. 154.

nité antidiphthérique : ils résistent, en injections sous-cutanées, à plusieurs doses mortelles de toxine ; ils supportent, en injections intra-cutanées, jusqu'à $1/5$ de dose mortelle sans réagir alors que les témoins montrent une nécrose avec une dose beaucoup plus faible de toxine ; leur sérum (0 c. c. 5), mélangé à $1/5$ de dose mortelle de toxine, ne produit aucune réaction en injection intra-cutanée ; enfin, l'injection de bacilles diphthériques dans la conjonctive préparée par la bile produit chez le témoin une diphthérie oculaire avec destruction du bulbe, alors qu'elle ne laisse aucune trace chez le cobaye vacciné.

Ces faits, énoncés sous la forme même que nous venons de rapporter, auraient plus de poids s'ils étaient agrémentés de quelques protocoles d'expériences. Ainsi, on aimerait être fixé sur la valeur de la toxine employée, les intervalles entre les frictions, les réactions cutanées des cobayes, le moment de l'apparition de l'immunité après la dernière friction, etc. Ces détails seraient d'autant plus importants à connaître que les auteurs mentionnés sont seuls à avoir réalisé l'immunité chez le cobaye par la voie cutanée.

Sans revenir sur nos propres essais infructueux et ceux de Szüle, rappelons qu'entre les mains de Becker (1) les résultats des frictions répétées n'ont pas donné de résultats appréciables, même après six semaines de traitement. Signalons enfin la publication toute récente de Schmidt (2) qui est en contradiction complète avec les faits décrits par Baar et Grabenhofer. Cet auteur a entrepris une série d'expériences avec la pommade de Löwenstein, ainsi qu'avec deux pommades qu'il a préparées lui-même avec de l'anatoxine fraîche et avec de l'anatoxine purifiée. Avec ces diverses pommades, Schmidt a frictionné la peau, rasée et lavée à l'alcool-éther, d'un assez grand nombre de cobayes. Voici quel fut le résultat de l'expérience avec la pommade originale de Löwenstein : tous les animaux inoculés avec une dose mortelle de toxine sous la peau, après avoir subi jusqu'à 6 frictions, à huit et quatorze jours d'intervalle, sont morts en même temps que les témoins ; ceux qui ont été frictionnés sept et huit fois ont eu

(1) *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 61, 1929, p. 164.

(2) *C. R. Soc. Biol.*, 104, p. 1351 ; séance du 5 juillet 1930.

une très légère survie sur les témoins; aucun des animaux, même parmi ceux éprouvés après trois mois et demi de traitement, n'a survécu à une simple dose mortelle de toxine. Les résultats furent sensiblement les mêmes chez les cobayes préparés avec de l'anatoxine fraîche ou purifiée par l'auteur.

A. — LA RÉCEPTIVITÉ DE LA PEAU DU LAPIN A LA TOXINE DIPHTÉRIQUE.

L'expérience nous a montré que, contrairement au cobaye, le lapin est d'une réceptivité remarquable vis-à-vis de la toxine portée sur la peau. Voici quel fut, après les tâtonnements inévitables du début, la technique que nous avons adoptée au cours de toutes ces expériences.

La toxine diphtérique est incorporée aux doses variant de 0 c. c. 1 à 10 cent. cubes dans une quantité toujours égale (10 grammes) de mélange de lanoline (deux parties) et de vaseline (une partie). Les crèmes ainsi obtenues sont étalées au moyen d'une spatule sur la peau rasée du flanc, par friction, jusqu'à l'apparition d'une coloration rose (1). Aussitôt après, l'abdomen est recouvert d'une compresse de gaze et d'un imperméable; le tout est maintenu en place pendant vingt-quatre heures au moyen d'une chemisette spéciale. Pour empêcher le lapin de se frotter contre la cage ou de se mordre au niveau de la peau irritée par la crème, on remet ensuite un pansement sec que l'on laisse encore à demeure pendant vingt-quatre heures.

Le lendemain de la friction et surtout les jours suivants, on assiste à une réaction cutanée qui va d'un léger œdème rose jusqu'à la nécrose étendue de la peau et à la formation d'une croûte noire. Ces réactions dont l'intensité marche de pair avec la teneur de la crème en toxine sont d'une régularité telle que l'on peut établir une échelle des lésions cutanées en rapport avec la concentration des crèmes employées. Au bas de l'échelle se place la lésion cutanée produite par la crème renfermant

(1) La toxine, obligeamment fournie par notre collègue, le docteur Loiseau, tuait le cobaye de 300 grammes à la dose de 1/500 à 1/1.000 de cent. cube. A partir d'une certaine concentration de la crème en toxine (1 à 10 cent. cubes), la crème est d'autant plus ferme que la quantité de toxine ajoutée est plus élevée; ce phénomène paradoxal, en apparence, s'observe également avec du bouillon ordinaire ou avec de l'eau physiologique.

0 c. c. 1 de toxine ; cette lésion, dirons-nous, est équivalente à une unité cutanée. Tout au sommet de l'échelle nous plaçons la lésion produite par la crème renfermant 10 cent. cubes de toxine ; cette lésion correspondra, d'après la mesure convenue, à 400 unités cutanées.

Lapin 80. — 3 mars : Friction de la peau du flanc droit avec la crème renfermant $\frac{1}{10}$ de cent. cube de toxine diphtérique.

5 mars : Plaque rouge sur fond pâle œdémateux.

6 mars : Même aspect.

7 mars : Œdème rouge.

10 mars : Croûte centrale humide.

12 mars : Croûte sèche.

13 mars : Croûtelette.

15 mars : Peau normale.

Lapin 16. — 20 octobre : Friction de la peau du flanc droit avec de la crème renfermant $\frac{1}{2}$ cent. cube de toxine diphtérique.

21 octobre : Œdème rose.

22 octobre : Œdème rouge.

24 octobre : Œdème rouge-bleu.

Du 26 octobre au 30 octobre : Croûte adhérente étendue.

1^{er} novembre : Croûte eczémateuse superficielle.

4 novembre : Aspect à peu près normal de la peau.

Lapin 34. — 13 décembre : Friction de la peau du flanc droit avec de la crème renfermant 1 cent. cube de toxine diphtérique.

14 décembre : Œdème rouge intense.

16 décembre : Œdème rouge noirâtre.

19 décembre : Deux croûtes noires sur fond induré.

23 décembre : Grosse croûte noire adhérente.

Du 25 décembre au 31 décembre : Croûte adhérente.

3 janvier : Croûte qui commence à se détacher.

7 janvier : Formation de tissu cicatriciel.

Lapin 25. — 20 octobre : Friction de la peau du flanc droit avec de la crème renfermant 3 cent. cubes de toxine diphtérique.

21 octobre : Œdème rouge.

22 octobre : Œdème rouge-bleu.

23 octobre : Œdème bleu.

25 octobre : Grosse croûte noire, très adhérente, qui persiste jusqu'au 10 novembre.

10 novembre : La croûte commence à se détacher progressivement pour disparaître le 12 novembre.

Ainsi, la lésion provoquée par la crème à 0 c. c. 1 de toxine, soit par la crème à une unité cutanée, aboutit à une croûte jaunâtre qui met, en moyenne, huit à dix jours à guérir. A la suite de la friction avec 1 cent. cube de toxine, ou 10 unités

cutanées, on assiste dès le lendemain à un fort œdème de la peau ; celle-ci prend rapidement une teinte rouge noirâtre. On voit ensuite apparaître une forte croûte noire, adhérente, qui ne commence à se détacher qu'au bout de dix à quinze jours.

Les réactions cutanées sont d'autant plus intenses et durables que les crèmes sont plus chargées en toxine ; cependant, quelle que soit la teneur de la crème en toxine — fût-elle même de 10 cent. cubes — la réaction reste toujours locale, et la vie de l'animal n'est jamais en danger.

Les animaux ayant reçu, la veille de la friction toxique, du sérum antidiphtérique sous la peau, restent indemnes de toute lésion locale.

En résumé, la toxine diphtérique, incorporée dans un mélange de lanoline-vaseline, donne lieu, en application locale, chez les lapins, à une gamme de lésions caractéristiques assez faciles à évaluer.

B. — L'IMMUNITÉ ANTIDIPHTÉRIQUE LOCALE PAR SIMPLE FRICTION, OU L'IMMUNITÉ NON SPÉCIFIQUE.

Au cours de nos essais de cuti-vaccination avec des échantillons de toxine diversement préparés (toxines chauffée, iodée, formolée, diluée, etc.), il nous fut donné d'observer un phénomène auquel nous étions loin de nous attendre : nous voulons parler de la cuti-immunité antidiphtérique locale, réalisée en dehors de toute vaccination.

Au début, pour vacciner les lapins contre la nécrose diphtérique de la peau, nous appliquions sur celle-ci des doses progressivement croissantes de toxine, tout comme nous le faisions autrefois lors de la cuti-vaccination anticharbonneuse ou antistaphylococcique. Chacune de ces applications était suivie d'une réaction inflammatoire, nécessitant un intervalle de huit à dix jours avant que la peau reprenne son aspect normal. En commençant les frictions avec une crème pauvre en toxine (1/25 de cent. cube pour 10 grammes de lanoline-vaseline), nous arrivions, au bout de trois ou quatre semaines, à faire supporter à l'animal une crème cinq fois plus riche en toxine (1/5 de cent. cube pour 10 grammes de lanoline-vaseline), et cela sans presque déterminer, à la fin, de réaction cutanée.

Nous étions convaincu d'avoir réalisé ainsi la cuti-immunité locale spécifique, car en portant la même crème (1/5 de cent. cube pour 10 grammes de lanoline-vaseline) sur la peau du côté opposé, nous voyions apparaître une tuméfaction rouge aboutissant à la formation d'une croûte ; cette croûte était semblable en tous points à celle que présenterait dans les mêmes conditions la peau d'un lapin neuf. Or, les expériences de contrôle, faites avec des crèmes ne renfermant pas du tout de toxine, nous ont montré que notre conclusion était, sinon inexacte, au moins prématurée.

En effet, lorsque dans un mélange de lanoline-vaseline on incorpore de la toxine diphtérique inactivée par le chauffage (60° à 80°), ou du sérum normal de cheval, ou du bouillon ordinaire, ou de l'eau physiologique, et que l'on frictionne la peau du lapin avec l'une de ces crèmes, on constate, dès le lendemain, que le lapin est immunisé contre la toxine en application cutanée. Cette immunité qui s'obtient également avec le mélange seul de lanoline-vaseline ou même, à un degré un peu moins marqué, par la simple action du rasoir, est localisée strictement à la région frictionnée et, fait particulièrement curieux, elle persiste pendant douze à quinze jours. Cette immunité est d'une solidité telle que la peau est susceptible de résister pendant toute cette période jusqu'à 30 unités cutanées de toxine ; chez plusieurs lapins, nous avons vu persister cette immunité pendant vingt jours.

Lapin 84. — 30 septembre : Préparation de la peau du flanc droit : (1 cent. cube de bouillon ordinaire pour 10 grammes de lanoline-vaseline).

2 octobre : Friction de la peau des deux flancs, droit et gauche ; avec de la crème renfermant 1/2 cent. cube de toxine diphtérique.

3 octobre : Rien à droite ; œdème rose à gauche.

4 octobre : Croûte eczémateuse à droite ; œdème rouge bleuâtre à gauche.

7 octobre : Croûte insignifiante à droite ; croûte adhérente, noirâtre à gauche.

12 octobre : Peau normale à droite ; croûte adhérente à gauche. La croûte à gauche disparaît le 16 octobre.

Lapin 85. — 30 septembre : Préparation de la peau du flanc droit (1 cent. cube de bouillon pour 10 grammes de lanoline-vaseline).

2 octobre : Friction de la peau du flanc droit avec de la crème renfermant 1 cent. cube de toxine diphtérique ; friction de la peau du flanc gauche avec de la crème renfermant 1/2 cent. cube de toxine diphtérique.

3 octobre : Rougeur superficielle à droite; gros œdème rose à gauche.

4 octobre : Presque rien à droite; œdème bleuâtre à gauche.

5 octobre : Rien à droite; escarre rouge à gauche.

7 octobre : Grosse croûte noire à gauche.

15 octobre : La croûte à gauche est en voie de cicatrisation.

Lapin 56. — 12 novembre : Préparation de la peau du flanc droit (1 cent. cube de sérum normal de cheval pour 10 grammes de lanoline-vaseline).

19 novembre : Friction de la peau des deux flancs, droit et gauche, avec de la crème renfermant 1 cent. cube de toxine diphtérique.

20 novembre : Rougeur superficielle à droite; œdème rose à gauche.

21 novembre : Peau normale à droite; œdème bleu à gauche.

23 novembre : Rien à droite; croûte noirâtre, très adhérente à gauche.

25 novembre : Grosse croûte adhérente à gauche.

Lapin 48. — 13 octobre : Préparation de la peau du flanc droit (1 cent. cube de sérum normal de cheval pour 10 grammes de lanoline-vaseline).

20 octobre : Friction de la peau du flanc droit avec de la crème renfermant 3 cent. cubes de toxine diphtérique et friction de la peau du flanc gauche avec de la crème renfermant 1/2 cent. cube de toxine diphtérique.

21 octobre : Peau rouge à droite; œdème rouge à gauche.

22 octobre : Peau à peu près normale à droite; œdème rouge bleuâtre à gauche.

23 octobre : A droite, comme la veille; à gauche, œdème bleu.

26 octobre : Peau normale à droite; grosse croûte adhérente à gauche.

30 octobre : Croûte adhérente à gauche qui persiste jusqu'au 5 novembre.

Lapin 41. — 8 novembre : Préparation de la peau du flanc droit (5 cent. cubes de bouillon ordinaire pour 10 grammes de lanoline-vaseline).

6 décembre : Friction de la peau du flanc droit avec de la crème renfermant 1 cent. cube de toxine diphtérique.

9 décembre : Œdème rouge bleuâtre.

11 décembre : Grosse croûte noire qui persiste jusqu'au 23 décembre.

23 décembre : La croûte commence à se détacher.

Lapin 93. — 4 octobre : Préparation de la peau du flanc droit (1 cent. cube d'anatoxine diphtérique pour 10 cent. cubes de lanoline-vaseline).

24 octobre : Friction de la peau des deux flancs, droit et gauche, avec de la crème renfermant 1/2 cent. cube de toxine diphtérique.

26 octobre : Rougeur superficielle à droite; rougeur superficielle à gauche.

27 octobre : Croûte en voie de formation à droite; croûte en voie de formation à gauche.

29 octobre : Croûte adhérente à droite; croûte un peu plus forte à gauche.

1^{er} novembre : Croûte superficielle à droite; croûte un peu plus épaisse à gauche.

3 novembre : Croûtelle à droite; croûtelle un peu plus forte à gauche.

8 novembre : Aspect à peu près normal de la peau des deux côtés.

Ce sont là des expériences typiques, choisies parmi beaucoup d'autres semblables. Il en ressort que la friction avec une crème quelconque, préparée avec du bouillon ordinaire (lapins

84, 85), ou avec du sérum normal de cheval (lapins 56, 18), est capable de préserver la peau contre la nécrose diphtérique produite par 5, 10, 30 doses cutanées de toxine. Cette immunité est strictement limitée à l'aire de la région sur laquelle avait porté la crème; la peau du côté opposé, chez le même lapin, réagit fortement non seulement aux mêmes doses de toxine (lapins 84, 56), mais encore aux doses deux fois (lapin 85), et six fois (lapin 18) inférieures à celles qui, du côté préparé, laissent l'animal à peu près indifférent.

Dans les expériences que nous venons de citer, l'immunité a été constatée après deux jours (lapins 84, 85) et après sept jours (lapins 56, 18); dans d'autres expériences, nous l'avons éprouvée après douze, quinze et quelquefois vingt jours. Ce délai passé, l'immunité du lapin antérieurement rasé, acquise par simple friction, disparaît, et cela aussi bien dans le cas où la crème a été préparée avec du bouillon (lapin 11) qu'avec de la crème à l'anatoxine (lapin 93).

Cette immunité non spécifique se manifeste d'une façon partielle dans le cas où la friction, bien qu'effectuée dans les douze ou quinze jours, est faite avec une crème renfermant plus de 30 unités cutanées de toxine. Dans ces cas, malgré la préparation préalable, on assiste à des réactions cutanées et à la formation de croûtes plus ou moins prononcées; celles-ci sont, certes, beaucoup moins épaisses et moins persistantes que lors de l'application des crèmes de même concentration sur la peau fraîchement rasée. Ainsi, la friction avec une crème à 50 unités cutanées de toxine produit une lésion équivalente, à peu de chose près, à celle qu'aurait provoquée, chez un lapin neuf, une crème à 20 unités. En d'autres termes, le lapin, dont la peau a été antérieurement préparée, bénéficie de l'immunité non spécifique lui permettant de neutraliser jusqu'à 30 unités cutanées environ (lapin 59).

Lapin 59. — 12 novembre : Préparation de la peau du flanc droit (1 cent. cube de sérum normal de cheval pour 10 grammes de lanoline-vaseline).

17 novembre : Friction de la peau des deux flancs, droit et gauche, avec de la crème renfermant 5 cent. cubes de toxine diphtérique.

19 novembre : Œdème rouge à droite; œdème bleu à gauche.

20, 21, 22 novembre : Même aspect que précédemment.

23 novembre : Croûte d'épaisseur moyenne à droite; très forte croûte noire à gauche.

25 novembre : Croûte gris foncé adhérente à droite ; croûte noire adhérente à gauche.

Du 26 novembre au 1^{er} décembre : La croûte diminue de jour en jour à droite ; à gauche, la croûte noire persiste.

12 décembre : La croûte noire, à gauche, est détachée et met à nu une ulcération sanglante qui se cicatrise au bout de huit jours.

La différence des réactions entre la peau antérieurement préparée et la peau fraîchement rasée se trouve plus effacée encore lorsqu'on applique, des deux côtés simultanément, une crème très riche en toxine, renfermant, par exemple, 10 cent. cubes de toxine (lapin 60).

Lapin 60. — 12 novembre : Préparation de la peau du flanc droit (1 cent. cube de sérum normal de cheval pour 10 grammes de lanoline-vaseline).

17 novembre : Friction de la peau des deux flancs, droit et gauche, avec de la crème renfermant 10 cent. cubes de toxine diphthérique.

19 novembre : Plaque noire œdématiée sur fond rouge à droite ; plaque noire sur fond rouge-bleu à gauche.

20 novembre : Croûte noire à droite ; plaque noire sur fond rouge-bleu à gauche.

23 novembre : Croûte noire adhérente à droite ; croûte noire très étendue à gauche.

Même aspect des deux côtés jusqu'au 4 décembre.

4 décembre : Croûte adhérente à droite ; grosse croûte saignante à gauche.

18 décembre : Croûte en voie de cicatrisation à droite ; à gauche, la croûte persiste jusqu'au 20 décembre.

Il nous reste à dire quelques mots au sujet de l'immunité locale non spécifique, que l'on réussit à mettre en évidence autrement que par la friction : nous voulons parler de l'épreuve à l'intradermo-réaction.

Ayant établi dans des expériences préliminaires que la toxine injectée dans la peau détermine, chez les lapins neufs, une cuti-réaction nette à la dose de 1/500.000^e de centimètre cube, nous avons préparé une série d'animaux en leur frictionnant la peau du flanc droit avec une crème renfermant 1 cent. cube de sérum ou de bouillon ordinaire ou d'eau physiologique.

Trois-quatre jours après, nous rasons la peau du flanc opposé, c'est-à-dire gauche, et nous injectons séance tenante, des deux côtés, dans la peau, 1/10 de centimètre cube de toxine d'une solution à 1 : 50.000, soit 1/500.000 de centimètre cube.

Dans les huit jours qui suivent, on ne manque pas de constater du côté droit, où la peau avait été préparée, une réaction plus bénigne et plus fugace que du côté gauche où la peau a été rasée le jour de l'épreuve. Loin d'être aussi frappante que lors de l'application des crèmes toxiques directement sur la peau, la différence entre les deux côtés est appréciable.

Cette immunité déterminée par la simple friction est-elle due au traumatisme subi par les terminaisons nerveuses, à l'épaississement de la couche épidermique ou à une toute autre cause? Les recherches ultérieures nous le diront; comme nous l'avons indiqué au début, ici nous nous bornons à exposer les faits tels que nous les avons observés, sans chercher à en pénétrer le mécanisme.

C. — L'IMMUNITÉ ANTIDIPHTHÉRIQUE LOCALE SPÉCIFIQUE.

Pour se rendre compte si cette immunité spécifique locale existe, il fallait commencer par se placer dans des conditions telles que l'immunité non spécifique ne pût pas entrer en jeu. Or, cette dernière se distingue par deux caractères importants, l'un ayant trait à sa durée et l'autre à sa solidité : le lapin ayant acquis l'immunité à la suite d'une simple friction de la peau ne saurait résister à 30 doses cutanées de toxine sans présenter des lésions locales importantes; d'autre part, l'immunité due au rasoir s'étend rarement au delà d'une période de douze à quinze jours. Si donc on pouvait créer une cuti-immunité telle que le lapin fût en état de supporter sans forte réaction plus de 30 doses cutanées et que cette cuti-immunité pût durer pendant plus de douze à quinze jours, on serait autorisé à ne pas tenir compte de l'intervention du rasoir, c'est-à-dire à invoquer le caractère spécifique du phénomène. Il va sans dire que, ces deux conditions une fois remplies, il fallait, en plus, avant d'affirmer la nature locale de l'immunité, s'assurer qu'elle ne s'étend pas à toute l'enveloppe cutanée, mais reste strictement limitée à la région ayant subi la cuti-vaccination.

Voici l'histoire succincte de trois lapins qui nous paraît à cet égard fort instinctive.

Lapin 81. — 21 novembre. Préparation de la peau du flanc droit (1 cent. cube de sérum normal de cheval pour 10 grammes de lanoline-vaseline).

27 novembre. Friction du flanc droit avec de la crème renfermant 3 cent. cubes de toxine diphtérique.

8 décembre. Friction du flanc droit avec la crème renfermant 5 cent. cubes de toxine diphtérique.

18 décembre. Même opération.

30 décembre. Friction des deux flancs, droit et gauche, avec la crème renfermant 5 cent. cubes de toxine diphtérique.

1^{er} janvier. Rougeur légère de la peau à droite; œdème bleu noir à gauche. La croûte noire du côté gauche persiste pendant près d'un mois.

Ce lapin (n° 81) a donc résisté à 50 unités de toxine, sans présenter de réaction appréciable. Eprouvé du côté opposé avec la même dose, il a montré une réaction intense, égale à celle d'un lapin neuf, ce qui exclut l'hypothèse de l'immunité générale.

Lapin 6. — 27 novembre. Préparation du flanc droit comme précédemment.

1^{er} décembre. Friction à droite avec la crème renfermant 3 cent. cubes de toxine diphtérique.

11 décembre. Friction à droite avec la crème renfermant 5 cent. cubes de toxine diphtérique.

22 décembre. Friction à droite avec la crème renfermant 10 cent. cubes de toxine diphtérique.

30 décembre. Friction à droite et à gauche avec la crème renfermant 10 cent. cubes de toxine diphtérique.

4 janvier. Peau normale à droite; à gauche, croûte noire épaisse, dure, qui persiste pendant près d'un mois.

Comme on le voit, ce lapin (n° 6) a pu résister, au prix d'une réaction passagère, à 100 doses cutanées de toxine du côté où il a subi la cuti-vaccination. Notons que la recherche d'antitoxine, d'après le procédé de Römer, faite la veille de l'épreuve (29 décembre), n'a pas pu révéler même 1/30 d'unité, ce qui est en accord avec la réaction cutanée intense qui a suivi l'application de la crème diphtérique le lendemain (30 décembre).

Lapin 2. — 27 novembre. Préparation du flanc droit comme d'ordinaire.

1^{er} décembre. Friction à droite avec la crème renfermant 3 cent. cubes de toxine diphtérique.

11 décembre. Même opération.

13 décembre. Friction à droite avec la crème renfermant 10 cent. cubes de toxine diphtérique.

31 décembre. Friction à droite et à gauche avec la crème renfermant 10 cent. cubes de toxine diphtérique.

Dans les jours qui ont suivi, les phénomènes cutanés furent les mêmes que chez le lapin précédent : à droite, réaction légère pendant soixante-douze à quatre-vingt-seize heures; à gauche, formation d'une croûte adhérente noire. Cette dernière a duré cependant un peu moins longtemps que chez

le lapin neuf, traité simultanément avec la même dose de toxine ; la différence bien que peu accusée doit, évidemment, être attribuée à un commencement de formation d'antitoxine (voir plus bas).

Ainsi, chez le premier de ces lapins (n° 81), la friction d'épreuve (30 décembre) fut effectuée avec une dose (5 cent. cubes) de toxine, supérieure à celle (3 cent. cubes) qui est tolérée dans le cas de l'immunité non spécifique ; chez le deuxième lapin (n° 6), la crème employée lors de l'épreuve (30 décembre) fut d'une concentration maxima (10 cent. cubes). Or, chez ces deux lapins, la peau du flanc droit, préalablement vaccinée, n'a presque pas réagi, alors que celle du flanc gauche, c'est-à-dire du flanc témoin, présenta une réaction extrêmement intense, comme s'il s'était agi de la peau d'un lapin neuf.

Chez le troisième lapin (n° 2), le caractère spécifique local de l'immunité ressort encore avec plus de netteté : chez celui-ci, l'intervalle entre la dernière intervention (15 décembre) et la friction d'épreuve (31 décembre) a été de seize jours, c'est-à-dire qu'il a dépassé le délai normal de l'immunité non spécifique. Comme chez le lapin précédent (n° 6), la friction d'épreuve a été faite avec une crème renfermant 10 cent. cubes de toxine, soit avec une dose plus que trois fois supérieure à la dose maxima tolérée. Cependant, dans les trois-quatre jours qui suivirent, la peau du flanc cuti-vacciné ne présenta plus qu'une croûte insignifiante, alors que celle du côté fraîchement rasée se couvrit d'une croûte noire extrêmement dure. Comme il fallait s'y attendre, la recherche d'antitoxine dans le sang chez les trois lapins donna un résultat négatif.

Il ressort donc de l'ensemble de ces faits qu'en pratiquant chez les lapins la cuti-vaccination au moyen des crèmes de plus en plus riches en toxine diphtérique, on crée une immunité qui est spécifique et rigoureusement locale.

D. — L'IMMUNITÉ ANTIDIPHTÉRIQUE GÉNÉRALE CONSÉCUTIVE A LA CUTI-VACCINATION.

Les phénomènes de l'immunité antidiphtérique locale, étudiés jusqu'ici, offrent en plus de leur intérêt théorique un avantage pratique appréciable : comme nous l'avons déjà montré, à la faveur de l'immunité non spécifique dont il a été

question précédemment, il devient possible de brûler rapidement les étapes et d'arriver à la cuti-immunité spécifique. Cette dernière, à son tour, permet, comme nous allons le montrer, d'arriver en peu de temps à réaliser l'immunité antidiphtérique générale.

Dans les premiers temps, tant que nous ignorions le phénomène d'immunité par friction, il nous fallait, pour mener à bien la vaccination par voie cutanée, des mois de préparation. Une des conditions essentielles du succès de l'immunisation fut l'emploi, surtout au commencement, de crèmes pauvres en toxine ($1/25$ à $1/10$ de centimètre cube), et cela sous peine de provoquer des nécroses cutanées; dès qu'on dépassait certaines concentrations de toxine, on perdait le bénéfice des opérations antérieures : les cellules nouvellement formées, remplaçant celles qui étaient nécrosées, gardaient entière leur réceptivité primitive. Toutes ces difficultés disparurent le jour où nous fûmes en mesure d'appliquer d'emblée des crèmes riches en toxine sur la peau antérieurement rasée. La durée de la cuti-immunisation se trouva de ce fait considérablement abrégée; aussi, là où il fallait auparavant deux-trois mois d'immunisation, a-t-il suffi d'une préparation de deux-trois semaines, tout au plus.

Un autre avantage du procédé employé, non moins appréciable, réside dans la possibilité d'obtenir l'immunité antidiphtérique générale : il ressort, en effet, de nos expériences que les lapins ayant acquis l'immunité locale spécifique de la peau deviennent rapidement porteurs d'antitoxine antidiphtérique.

Voici l'histoire d'un de ces lapins, lequel a passé, en l'espace de cinq-six semaines, par les trois phases successives : celles d'immunité locale non spécifique, d'immunité locale spécifique et d'immunité générale.

Lapin 66. — 17 novembre. Préparation de la peau du flanc droit (1 cent. cube de bouillon pour 10 grammes de lanoline-vaseline).

21 novembre. Friction à droite avec la crème à 2 cent. cubes de toxine.

24 novembre. Friction à droite avec la crème à 3 cent. cubes de toxine.

1^{er} décembre. Friction à droite avec la crème à 5 cent. cubes de toxine.

6 décembre. Même opération.

15 décembre. Friction à droite avec la crème à 10 cent. cubes de toxine.

18 décembre. Même opération.

30 décembre. Friction à droite et à gauche avec la crème à 10 cent. cubes de toxine.

1^{er} janvier. Légère réaction de la peau, pareille des deux côtés.

L'injection dans la peau du lapin de 1/25.000 de centimètre cube de toxine fut sans effet, alors que l'injection dans la peau d'un lapin neuf de 1/500.000 de centimètre cube, soit d'une dose vingt fois inférieure, donna lieu à une réaction caractéristique qui a persisté pendant huit à dix jours.

Le sérum de ce lapin, mélangé, à la dose de 1/40 de centimètre cube, avec une dose sûrement mortelle de toxine (1/500 de centimètre cube), ne provoqua, en injection sous-cutanée, aucune réaction chez le cobaye neuf.

Le dosage du pouvoir antitoxique, d'après le procédé de Römer, a permis de constater dans le sérum en question plus de 1/5 d'unité et moins de 1 unité; notons que chez certains lapins cuti-vaccinés dans les mêmes conditions il nous a été donné de constater jusqu'à 2 unités antitoxiques.

En résumé, à la suite d'une friction préalable anodine, le lapin devient à même de résister à l'application cutanée d'une dose massive (3 cent. cubes) de toxine diphtérique; ensuite il acquiert rapidement l'immunité locale cutanée spécifique (5 cent. cubes, 10 cent. cubes), laquelle ne tarde pas à s'étendre à l'organisme tout entier. La présence de cette immunité générale est constatée par l'intradermo-réaction, par le dosage du pouvoir antitoxique du sérum et par l'absence de la réaction cutanée lors de l'application d'une crème très chargée en toxine sur la peau du côté opposé à celui qui avait été soumis à la cuti-vaccination.

Ces faits établis, il nous restait à préciser les deux points suivants :

1^o L'immunité générale qu'acquiert le lapin cuti-vacciné est-elle comparable, quant à sa durée, à celle que confère la vaccination active ou bien est-elle passagère comme celle que crée la vaccination passive?

2^o L'immunité du lapin cuti-vacciné est-elle assez solide pour lui permettre de résister à l'injection de toxine diphtérique sous la peau?

Voici, en raccourci, l'histoire d'un des lapins qui avait été préparé en vue de ces deux questions.

Lapin 76. — 15 octobre. Préparation de la peau des deux flancs (1 cent. cube d'eau physiologique pour 10 grammes de lanoline-vaseline).

18 octobre. Friction à droite avec la crème à 20 unités cutanées de toxine (2 cent. cubes).

22 octobre. Friction à gauche avec la crème à 30 unités de toxine (3 cent. cubes).

31 octobre. Friction à droite et à gauche avec la crème à 50 unités de toxine (5 cent. cubes).

10 novembre. Friction à droite avec la crème à 50 unités de toxine (5 cent. cubes).

17 novembre. Friction à droite et à gauche avec la crème à 100 unités de toxine (10 cent. cubes).

On laisse le lapin au repos pendant deux mois environ.

15 janvier. Friction à droite et à gauche avec la crème à 100 unités de toxine (10 cent. cubes).

La peau des deux côtés reste indemne de toute réaction.

2 février. On reprend le lapin quinze jours après et on lui injecte sous la peau 1/100 de centimètre cube de toxine diphtérique; en même temps on injecte, sous la peau, à 2 lapins neufs : à l'un, 1/100 de centimètre cube de toxine, à l'autre, 1/300 de centimètre cube de toxine. Les 2 témoins meurent au bout de trois jours; le lapin 76 résiste.

Il résulte de cette expérience que le lapin cuti-vacciné conserve son immunité pendant, au moins, deux mois et, vraisemblablement, pendant un temps encore plus long; on est donc en présence d'une immunité active. D'autre part, ce lapin cuti-vacciné se montre immunisé non seulement contre la toxine appliquée sur la peau, mais encore contre plusieurs doses mortelles de toxine introduites par la voie sous-cutanée.

CONCLUSION.

En frictionnant la peau du lapin avec une crème anodine ou même en la rasant simplement, on crée une immunité vis-à-vis de la toxine diphtérique, locale et non spécifique; à la faveur de celle-ci, on réalise au moyen de la crème diphtérique en peu de temps une immunité locale spécifique, laquelle fait rapidement place à l'immunité antidiphtérique générale, solide et durable.

CONTAMINATION D'UNE LYPHPE VACCINALE PAR LE VIRUS DE LA FIÈVRE APHTEUSE

par le D^r T. VAN HEELSBERGEN.

*(Institut des maladies parasitaires et infectieuses
de l'Université d'Utrecht. Directeur : Professeur L. de Blieck.)*

Au début de l'année 1930, Lars Slagsvold, chef de la clinique vétérinaire de l'État à Oslo (Norvège), a vacciné quelques bovidés avec du vaccin provenant de l'Institut de vaccine de l'État.

Fait inattendu, les animaux vaccinés montraient, outre des pustules aux lieux des inoculations, des symptômes de fièvre aphteuse. La preuve qu'il s'agissait de cette maladie et non d'une forme atypique de vaccine était fournie par les phénomènes spécifiques (éruption vésiculeuse typique) sur la muqueuse buccale des bovidés vaccinés. Une autre constatation confirma la présence du virus aphteux dans le vaccin : c'était que, par les voies naturelles de la contagion, des veaux, des porcs et un mouton qui se trouvaient dans la même étable présentèrent bientôt des symptômes typiques de fièvre aphteuse, tandis qu'un cheval, également présent, restait indemne.

Des cobayes, inoculés avec la lympe vaccinale dans la plante des pattes postérieures, firent une éruption d'aphtes, locale d'abord, généralisée ensuite.

Tout ceci justifiait la constatation que la lympe vaccinale, distribuée par l'Institut d'État, était capable de produire, outre la vaccine, des lésions de fièvre aphteuse.

Il va de soi que cette constatation a suscité beaucoup d'agitation dans certains milieux, d'autant plus que la lympe vaccinale en question était en circulation depuis quelque temps déjà. Plusieurs personnes supposaient que le vaccin avait été souillé sur place, là où on l'employait, plutôt que d'admettre sa contamination avant sa distribution par l'Institut d'État.

Cependant des enquêtes, instituées par les médecins, ont

confirmé, et d'une façon convaincante, les constatations de Slagsvold.

Le problème se pose donc ainsi :

Est-ce que le virus vaccinal norvégien n° 980, outre sa propriété de produire des pustules de vaccine, est capable de déterminer, chez les animaux sensibles, des symptômes de fièvre aphteuse?

Dans ce cas il s'agirait d'un virus à propriétés *dualistes*.

Ou faut-il accepter la présence des deux sortes de virus, ce qui fait supposer que le vaccin norvégien (n° 980) a été souillé accidentellement avec le virus aphteux? La lymphe en question serait donc un mélange de virus vaccinal et de virus aphteux.

Sans méconnaître les risques qu'entraîne cette souillure du vaccin pendant les périodes d'épizootie de fièvre aphteuse, c'est la dernière hypothèse qu'on juge *a priori* comme la plus probable.

Le problème se pose donc de savoir s'il y a *unité* ou *dualité* de virus dans la lymphe vaccinale norvégienne n° 980.

Est-il possible de répondre à cette question par voie biologique?

EXPÉRIENCES.

C'est de l'Institut d'État pour la santé publique à Oslo qu'on a fait venir le vaccin en question. Il s'agit de la souche n° 980 qui fut recueillie le 14 juin 1929 du veau n° 10, en Norvège. Ce veau avait été inoculé simultanément avec une souche de vaccin norvégienne et une autre de provenance danoise.

Déjà plusieurs fois cette souche 980 avait donné lieu, en Norvège, à des symptômes de fièvre aphteuse chez la vache.

Détail intéressant : cette souche de vaccin, malgré son séjour à la glacière depuis le 14 juin 1929, avait conservé son aptitude à donner la fièvre aphteuse.

CONFIRMATION DES RÉSULTATS NORVÉGIENS. VEAU 510.

Le 3 mai 1930 nous avons inoculé, dans la peau de l'abdomen, le veau 510 avec la souche vaccinale n° 980.

Résultats : Au bout de deux jours l'animal montre déjà des

symptômes de fièvre aphteuse sur la muqueuse buccale : ptyalisme, rougeur, aphtes, etc. Peu après, la peau de l'abdomen montrait, aux points d'inoculation, une éruption typique de pustules de vaccine.

L'animal était gravement malade, avec température s'élevant jusqu'à 41°2 C. Pas de localisations aux pieds. Le 11 mai



FIG. 1. — Fièvre aphteuse chez le veau n° 512, inoculé avec la sérosité des phlyctènes du veau n° 510.

Soixante heures après l'inoculation, le liquide des aphtes du veau n° 510 ne contient pas encore de virus vaccinal. Le contenu des vésicules du veau n° 510 détermine la fièvre aphteuse, mais non la vaccine.

la température était redevenue normale et l'animal entré en voie de guérison. Cette expérience confirme donc la propriété du vaccin 980 de déterminer la fièvre aphteuse.

ISOLEMENT DU VIRUS APHTEUX.

Après la constatation ci-dessus, il était d'intérêt essentiel de tâcher d'isoler le virus aphteux éventuellement présent dans le vaccin n° 980.

A cet effet, on a inoculé, le 8 mai, le veau 512 avec le contenu des aphtes du veau 510, par frottement sur la peau de l'abdomen, ainsi que sur la muqueuse buccale.

En même temps on a infecté un lapin sur la peau du dos avec le liquide des vésicules du veau 510.

Le *résultat* de ces expériences fut qu'au bout de deux jours le veau présenta des symptômes typiques de fièvre aphteuse : Développement d'aphtes et exanthème interphalangé, avec ptyalisme prononcé.

Par contre, la peau du veau ne montra aucune trace d'éruption de pustules de vaccine.

Le *lapin* n'a pas non plus présenté d'éruption sur la peau infectée avec le contenu des aphtes.

Ces expériences démontrent qu'on a réussi à isoler de la lymphe vaccinale norvégienne un virus aphteux, incapable de produire la vaccine chez le veau, ni chez le lapin.

On a recueilli cette souche de virus aphteux pour la conserver à la glacière dans une solution de 50 p. 100 de glycérine en eau physiologique.

Depuis ce jour, cette souche a été utilisée de nouveau plusieurs fois pour des expériences sur la fièvre aphteuse, mais sans donner lieu à aucune éruption de pustules de vaccine.

Le 11 juin, donc un peu plus d'un mois après l'inoculation avec la sérosité des aphtes, le veau 512 a été inoculé de nouveau par frottement sur la peau de l'abdomen, cette fois avec la souche du virus *vaccinal* que nous avons également isolée du mélange norvégien (voir ci-dessous).

Le résultat fut que la fièvre aphteuse n'avait conféré aucune immunité pour le virus vaccinal.

Le veau 512 répondit à la vaccination par une éruption étendue et typique de pustules de vaccine.

ISOLEMENT DU VIRUS VACCINAL.

Avec le matériel originel (lymphe norvégienne 980) on a infecté, le 3 mai 1930, 4 jeunes coqs par frottement sur la crête.

Le *résultat* de cette infection fut une réaction faible aux points de friction chez 2 des 4 oiseaux. La réaction consistait, comme on s'y attendait, en une formation de petites pustules tendant

à la suppuration qui, au bout de peu de temps, se transformèrent en croûtes sèches. Dans ce cas la réaction fut faible, tandis qu'on observe parfois des réactions assez fortes chez la poule après inoculation de virus vaccinal.

Afin d'éviter l'action éventuellement atténuante de l'organisme de l'oiseau sur le virus, on a recueilli celui-ci le troisième



FIG. 2. — Réaction vaccinale du veau n° 511.

Après passage par l'oiseau, le virus aphteux a disparu et chez le veau inoculé on n'observa que des pustules de vaccine.

jour après la vaccination, et on l'a employé le 6 mai pour l'infection de la peau du veau 511.

Résultat : Sur la peau de ce veau une éruption de pustules vaccinales s'est développée, tandis qu'il ne s'est produit aucun symptôme de la fièvre aphteuse.

Le contenu des pustules du veau 511 a été recueilli et, avec cette pulpe vaccinale, le veau 513 a été fortement infecté sur la peau.

Comme le veau précédent, celui-ci n'a montré aucun symp-

tôme de fièvre aphteuse. Mais une éruption typique de pustules vaccinales a évolué, quelques jours après, aux points d'inoculation.

Le 15 juin, les deux veaux vaccinés 511 et 513 ont été exposés à l'infection aphteuse par contact, par l'intermédiaire d'un animal infecté par l'inoculation de la souche norvégienne.

Dans le délai de trois-quatre jours, les deux veaux ont contracté une forme grave de fièvre aphteuse. Comme on pouvait s'y attendre, les réactions vaccinales n'avaient produit aucune immunité vis-à-vis du virus aphteux.

*
* *

Nous sommes donc en possession :

1° D'une souche pure de *virus aphteux*, et 2° d'une souche pure de *virus vaccinal*, tous deux isolés de la lympe norvégienne n° 980.

Ce résultat a été atteint en éliminant le virus aphteux par passage par l'oiseau, alors que le virus vaccinal n'était pas encore présent dans les aphtes précoces du veau 510.

On a également infecté, avec la lympe norvégienne 980, la peau rasée du dos de quelques lapins.

Une éruption de pustules typique et assez intense a suivi l'inoculation. Aucun des lapins n'a présenté de symptômes de fièvre aphteuse.

Comme le veau norvégien n° 10 a été inoculé avec le vaccin norvégien et simultanément avec la vaccino-lapine danoise, on ne peut pas exclure la possibilité que le virus aphteux ait été introduit en Norvège par cette vaccino-lapine danoise. Cependant, l'éventualité d'une contamination d'origine norvégienne est le plus probable.

REMARQUE.

D'après Belin (1) le virus aphteux, en symbiose avec le virus vaccinal, subirait une atténuation chez le veau, à condition qu'on recueille le mélange des virus le quatrième, cinquième ou sixième jour après l'inoculation.

(1) *Recueil de méd. vét. Bull. et Mém.*, 102, n° 14.

Sans prononcer de jugement à ce sujet, je veux attirer l'attention sur le fait que le virus aphteux norvégien, malgré son association avec le virus vaccinal (souche 980), n'a subi aucune atténuation. Tous les veaux que j'ai inoculés ont contracté une forme grave de fièvre aphteuse. On a observé des températures de 41°C et au delà. Les animaux paraissaient très malades et chez l'un il y eut aussi des localisations aux pieds.

Slagsvold a observé chez deux veaux, à l'autopsie, une dégénérescence typique et étendue du muscle cardiaque.

LES BACTÉRIOLYSINES CHEZ LES INSECTES

Par V. ZERNOFF.

Les bactériolysines chez les chenilles envers les différents microbes *in vivo* ont été observées par S. Métalnikov (1) et Paillot (2).

En vue de déceler ces anticorps *in vitro* dans le sang de chenilles de *Galleria mellonella* (3), nous avons entrepris les expériences suivantes.

EXPÉRIENCE I. — 30 chenilles de *Galleria mellonella* ont été injectées avec la culture chauffée de B. de Danysz.

Le lendemain, 0 c. c. 5 du sang de ces chenilles a été prélevé aseptiquement dans un petit tube stérile. Après avoir ajouté 1 goutte d'émulsion épaisse du même microbe, on l'a mis à l'étuve à 30°. Toutes les dix minutes, on a pris une petite goutte de sang pour préparer les frottis et pour les examiner sous le microscope.

Vingt minutes après, on observait une grande diminution du nombre des microbes; ceux qui restaient étaient transformés en partie en granules.

Trente minutes après, les bacilles étaient rares. Les granules commençaient à disparaître.

Quarante minutes après : absence totale de microbes, très peu de granules. Le même procédé a été fait comme contrôle avec le sang des chenilles normales. Dans ce cas, on n'a pas pu observer le phénomène de bactériolyse même après plusieurs heures. La quantité de microbes ne diminuait pas, le nombre de bacilles transformés en granules était tout à fait insignifiant et même quelquefois nul.

La bactériolyse peut être vérifiée au moyen d'ensemencements sur gélose de la culture lysée. Au bout de vingt-quatre heures elle reste stérile, ce qui montre que les microbes sont détruits.

Dans le même but, nous avons fait des expériences sur les souris.

EXPÉRIENCE II. — Deux tubes ont reçu chacun 3 cent. cubes d'une culture de B. de Danysz sur bouillon. Puis, dans le premier tube, on a ajouté

(1) MÉTALNIKOV. L'infection microbienne et l'immunité chez la mite des abeilles *Galleria mellonella*. Monographie de l'Institut Pasteur, 1928.

(2) C. R. Académie des Sciences, 169, p. 1122; 172, p. 398.

(3) ZERNOFF. Ces Annales, 44, p. 604.

0 c. c. 6 de sang de chenilles préalablement immunisées contre le même microbe. Dans le deuxième tube, qui devait servir de contrôle, on a ajouté la même quantité de sang de chenilles normales. Après avoir laissé les deux tubes à l'étuve pendant cinq heures, on a injecté deux lots de 5 souris avec ces cultures. Ainsi, chaque souris recevait 0 c. c. 6 de culture additionnée de sang de chenilles. Toutes les souris injectées avec le contenu du premier tube sont restées vivantes. Les souris injectées avec la culture du deuxième tube sont mortes au bout de quatre à sept jours.

Nous avons observé le même phénomène de bactériolyse *in vitro* dans le sang de chenilles immunisées en faisant des expériences avec les microbes suivants :

Bacille paratyphique A et B, bacille dysentérique de Shiga-Dopter, vibrion du choléra, vibrion de Metchnikoff et bacille de *Pyrausta* n° 4.

Nous avons pu observer également dans le sang de chenilles immunisées de *Pyrausta nubilalis* des bactériolysines analogues *in vitro* envers le bacille de Danysz et le vibrion du choléra.

Nous avons recherché les bactériolysines *in vitro* chez un insecte orthoptère du groupe des *Phasmides carausius* (*Dixippus*) *morosus* Br. et Redt. Voici une de nos expériences faite selon la technique habituelle.

EXPÉRIENCE III. — 3 *Carausius* ont été injectés avec une culture chauffée de B. de Danysz ; trois jours après, l'injection a été répétée. Le lendemain de la dernière vaccination leur sang a été prélevé dans un tube stérile. Comme contrôle, dans un autre tube a été prélevé le sang d'insectes non vaccinés. Puis, le sang a été additionné de quelques gouttes d'émulsion du même microbe et a été porté à l'étuve. Les examens microscopiques successifs ne montraient pas de bactériolyse.

La même expérience avec des résultats analogues a été faite avec le vibrion du choléra.

En résumé, le sang de *Carausius* normales aussi bien que vaccinées ne montre aucun pouvoir bactériolytique envers ces microbes.

Nous avons déjà signalé (1) que les bactériolysines ne sont pas spécifiques. Ainsi, le sang de chenilles immunisées contre la culture de B. de Danysz provoque la bactériolyse des vibrions cholériques. Au cours de nos expériences, nous nous sommes

(1) ZERNOFF. Ces Annales, 44, p. 604.

persuadé que même l'injection de corps non microbiens peut provoquer l'apparition de bactériolysines dans le sang des chenilles. Mais leur intensité et le temps nécessaire pour leur action varie selon la substance injectée.

L'expérience suivante peut servir d'exemple d'apparition des bactériolysines après injection de différentes substances.

EXPÉRIENCE IV. — Un lot de chenilles de *Galleria mellonella* a été injecté avec une culture chauffée du Vibrion de Metchnikoff. Le lendemain, on a

TABLEAU I.

SANG	CULTURE	BACTÉRIOLYSE		
		40 minutes	1 heure	3 heures
1. Sang de chenilles vaccinées contre V. Metchnikoff.	Culture de vibrion de Metchnikoff.	+	+	+
2. Sang de chenilles vaccinées contre B. de Danysz.	Culture de vibrion de Metchnikoff.	+	+	+
3. Sang de chenilles injectées avec le sérum de cheval.	Culture de vibrion de Metchnikoff.	±	±	+
4. Sang de chenilles injectées avec le bouillon.	Culture de vibrion de Metchnikoff.	±	±	+
5. Sang de chenilles normales.	Culture de vibrion de Metchnikoff.	—	—	—

prélevé 0 c. c. 5 de sang de ces chenilles, que l'on a mis dans un petit tube stérile.

Dans un deuxième tube a été mise la même quantité de sang de chenilles injectées préalablement avec une culture chauffée de B. de Danysz.

Dans un troisième tube a été mis le sang de chenilles préalablement injectées avec le sérum du cheval.

Dans le quatrième tube, on a placé le sang des chenilles préalablement injectées avec le bouillon.

Enfin, dans le cinquième tube a été mis le sang de chenilles normales.

Chacun de ces tubes a été additionné d'une goutte d'émulsion épaisse de vibrion de Metchnikoff. Tous ont été portés à l'étuve. En examinant le sang de ces cinq tubes, nous avons observé la bactériolyse complète dans les deux premiers tubes après quarante minutes. Dans le troisième et le quatrième tubes, la bactériolyse était peu marquée après le même temps, mais presque

complète après une heure. Tandis que dans le dernier tube, avec du sang normal, les vibrions n'étaient pas modifiés même après plusieurs heures.

Le tableau I donne les résultats de cette expérience.

Le mode d'immunisation a une certaine influence sur l'apparition des bactériolysines. Ainsi, nous voyons que la bactériolyse n'étant pas spécifique dépend tout de même de l'agent qui produit l'immunisation. D'habitude, nous immunisons les chenilles avec des cultures chauffées en dilutions relativement concentrées (I ou II gouttes d'émulsion épaisse sur 1 cent. cube d'eau physiologique en injectant 1/80-1/100 cent. cube de ces dilutions). Mais il suffit d'injecter une dose presque 100 fois plus faible (1/80-1/100 cent. cube du vaccin à la concentration d'une anse d'émulsion épaisse sur 10 cent. cubes d'eau physiologique) pour que les bactériolysines apparaissent dans le sang de ces chenilles. Mais alors, leur action est un peu plus lente et moins intense.

D'après S. Métalnikoff, on sait que l'immunisation des chenilles se produit extrêmement vite; déjà quatre heures après la vaccination, ces insectes deviennent complètement immunisés. Nous avons établi qu'en même temps les bactériolysines se forment dans leur sang; ce que nous montrent les résultats de l'expérience V.

EXPÉRIENCE V. — Le 2 avril, à 10 heures du matin, 40 chenilles ont été injectées avec une culture chauffée de B. de Danysz. Quatre heures trente minutes après, le sang de ces chenilles a été prélevé dans un petit tube; puis, 1 goutte d'émulsion épaisse de la même culture du même microbe on l'a additionné. Le tube a été porté à l'étuve. L'examen des frottis préparés avec ce sang montre :

Une heure après, absence de microbes, beaucoup de granules.

Deux heures après, le nombre de granules est fortement réduit; bactériolyse complète.

D'autre part, on sait que l'immunité active (1) et passive (2) chez les chenilles se maintient plusieurs jours. Par contre, les bactériolysines qui apparaissent si vite après la vaccination disparaissent complètement après soixante-douze heures. Les résultats de nos nombreuses expériences montrent que depuis ce temps le sang de chenilles vaccinées ne produit plus de

(1) CHORINÉ. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 97, 1927, p. 1288.

(2) ZERNOFF. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 97, 1927, p. 1697.

bactériolysines et devient à ce point de vue aussi inactif que le sang de chenilles normales. Mais depuis l'immunisation jusqu'au troisième jour, son pouvoir bactériolytique est toujours extrêmement fort. Ce sang peut être additionné de très grandes quantités de microbes; ceux-ci sont toujours complètement lysés. Il n'est pas même nécessaire d'employer du sang homogène. En le diluant avec de l'eau physiologique 2, 4 et 6 fois, on ne change presque pas l'effet de la bactériolyse. Mais déjà, quand on dilue le sang 10 fois, la bactériolyse se manifeste plus lentement; néanmoins elle est encore assez intense et il suffit de X gouttes de sang ainsi dilué pour transformer en granules au bout de deux heures II gouttes d'émulsion épaisse préparée avec une culture de B. de Danysz. On peut encore constater l'action bactériolytique en ajoutant IV gouttes de sang de chenilles immunisées à une émulsion épaisse préparée avec une culture sur gélose de B. de Danysz dans un centimètre cube d'eau physiologique.

Dans nos expériences précédentes, nous avons établi que les bactériolysines sont thermolabiles et qu'elles sont détruites à une température allant de 60° à 75°. Ces résultats sont exacts pour le sang qui n'est pas dilué, car à la température de 75° il se coagule complètement, ce qui change ses propriétés physiques et le rend moins actif envers les microbes. Mais en diluant ce sang préalablement avec de l'eau physiologique, on peut le chauffer à de très hautes températures sans qu'il perde son pouvoir bactériolytique.

EXPÉRIENCE VI. — Nous avons prélevé le sang de chenilles vaccinées; après l'avoir dilué quatre fois avec de l'eau physiologique, nous l'avons réparti dans quatre petits tubes. Le premier était mis vingt minutes au bain-marie à 80°, le deuxième à 90°, le troisième à 100° et le quatrième a été porté pendant vingt minutes à l'autoclave à 115°. Après avoir refroidi tous ces tubes, nous avons mélangé et broyé aseptiquement les caillots de sang coagulé; ensuite, nous avons ajouté dans chaque tube 1 goutte d'émulsion de B. de Danysz. Puis, tous les tubes ont été portés à l'étuve à 30°. Dans les trois premiers tubes, le phénomène de bactériolyse commence à se manifester après une heure trente minutes; deux heures après, on trouve beaucoup de granules, et trois heures après la bactériolyse est complète. Cependant, dans le quatrième tube, pendant ce temps-là, les bacilles de Danysz sont intacts, et le lendemain, c'est-à-dire dix-huit heures après, une certaine partie est transformée en granules. En agissant de même avec le sang de chenilles normales, nous n'avons pu remarquer aucun phénomène de bactériolyse.

Cette expérience montre qu'il est difficile de déterminer la température exacte au-dessus de laquelle les bactériolysines sont détruites. Cependant, en comparant ces résultats avec ceux de nos expériences précédentes, on voit qu'après avoir chauffé le sang au-dessus de 60° ses propriétés sont essentiellement modifiées; le temps nécessaire pour la bactériolyse est plus long; ce qui montre que les bactériolysines deviennent moins actives.

Certaines substances chimiques, comme le chloroforme, ont sur les bactériolysines des chenilles une action analogue à celle des hautes températures.

En émulsionnant le sang prélevé sur des chenilles immunisées avec quelques gouttes de chloroforme et en additionnant des microbes de Danysz, nous avons pu remarquer que la bactériolysine se développait plus lentement et exigeait à peu près trois heures.

La thermostabilité et aussi l'absence de spécificité sont les caractères les plus typiques des bactériolysines de chenilles, ce qui les différencie des bactériolysines de mammifères. N'y a-t-il pas quelque analogie entre nos bactériolysines et certaines souches de bactériophage? Sur le conseil du Dr Roux, nous avons recherché si le principe bactériolytique du sang de chenilles immunisées est transmissible *in vitro*. Dans ce but, nous avons entrepris différentes expériences. En voici une à titre d'exemple :

EXPÉRIENCE VII. — On a placé dans un petit tube 0,25 c. c. de sang de chenilles préalablement immunisées avec la culture chauffée de B. de Danysz. Puis, ce sang était additionné de la même quantité du bouillon et d'une goutte d'émulsion épaisse du même microbe. Le mélange a été mis à l'étuve à 30° et la bactériolyse se développait comme d'habitude. Le même procédé a été fait avec le sang de chenilles normales, mais le contrôle ne montrait pas la bactériolyse. On a conservé les deux liquides jusqu'au lendemain. On a préparé alors deux tubes avec des émulsions de B. de Danysz dans 0 c. c. 5 de bouillon. Dans un tube, on a mis VI gouttes du mélange lysé; dans l'autre, VI gouttes de celui du contrôle. Cette fois, la bactériolyse dans le premier tube se développait très lentement et seulement après dix-huit heures: il y avait beaucoup de granules, mais la lyse n'était pas complète. Les microbes du tube de contrôle n'étaient pas modifiés. En faisant encore un passage, on pouvait à peine remarquer la différence entre le mélange qui provenait du sang de chenilles immunisées et celui du contrôle.

Mais si ces bactériolysines ne sont pas transmissibles comme

le bactériophage, elles conservent leurs propriétés *in vitro* pendant un temps assez long.

EXPÉRIENCE VIII. — On a mis dans deux petits tubes du sang de chenilles immunisées avec une culture chauffée de B. de Danysz dans la proportion de deux parties de sang et trois parties d'eau physiologique. Puis, on a porté ces tubes au bain-marie à 100° pendant trente minutes. Les tubes ont été scellés et conservés au laboratoire; cinq jours après, un tube a été ouvert et on y a ajouté 11 gouttes d'émulsion épaisse préparée avec une culture de B. de Danysz. Le mélange a été porté à l'étuve à 30° et trois heures après la bactériolyse fut complète.

Le deuxième tube a été conservé pendant quatre mois, puis il a été ouvert et on y a ajouté 1 goutte d'émulsion épaisse de B. de Danysz. Mais cette fois la bactériolyse ne s'est pas manifestée.

Des expériences exposées dans le présent travail on peut tirer les *conclusions* suivantes :

1° Le sang de chenilles de *Galleria mellonella* et *Pyrausta nubilalis* immunisées renferme des bactériolysines envers de différents microbes.

2° Les recherches des bactériolysines chez *Carausius morosus* ont donné des résultats négatifs.

3° La bactériolyse des microbes dans le sang des insectes peut être prouvée :

- a) Par l'examen microscopique;
- b) Par l'ensemencement sur gélose;
- c) Par l'injection de cultures lysées aux souris.

4° Les bactériolysines n'étant pas spécifiques peuvent être provoquées par injection d'une substance albuminoïde étrangère, mais alors leur action est un peu plus faible.

5° La quantité de substance injectée ne joue qu'un rôle secondaire.

6° L'action des bactériolysines peut être constatée quatre heures et demie après l'immunisation, mais elles disparaissent après trois jours, tandis que l'immunité se maintient plusieurs jours.

7° Les températures très élevées (115°) ne détruisent pas les bactériolysines dans le sang dilué avec de l'eau physiologique.

8° La bactériolyse est ralentie dans le sang chauffé au-dessus de 60°.

9° Le chloroforme a une action semblable sur la bactériolyse.

10° Les bactériolysines ne sont pas transmissibles *in vitro*.

11° Elles peuvent être conservées *in vitro* plusieurs jours.

SUR LA TENEUR EN ZINC DU FOIE CHEZ LE RAT EN VOIE DE CROISSANCE,

par M. GABRIEL BERTRAND et M^{lle} Y. BRANDT-BEAUZEMONT.

Les expériences sur le rat que nous avons publiées il y a quelques mois (1) ont confirmé les faits découverts par l'un de nous, en collaboration avec Vladesco (2), au sujet des variations remarquables que présente la teneur en zinc de l'organisme animal au cours de la vie; elles ont confirmé, notamment, que la teneur en zinc des mammifères est maxima au moment de la naissance, qu'elle diminue peu à peu durant la période d'alimentation lactée, le lait étant très pauvre en métal, et remonte à partir du sevrage.

Ces faits, nous l'avons rappelé antérieurement, ont été méconnus ou même niés par d'autres expérimentateurs (3). Comme ils n'ont pas seulement une importance théorique, mais des conséquences au point de vue de l'alimentation des nouveau-nés, nous avons continué leur étude. Aujourd'hui, nous donnons les résultats que nous avons obtenus en déterminant les proportions de zinc contenues dans le foie de rats blancs sacrifiés à diverses périodes de leur vie : le jour de la naissance, vers la fin du régime exclusivement lacté (4), quelque temps après le sevrage, enfin à l'âge adulte.

L'origine des animaux, leur mode d'alimentation ont été les mêmes que dans nos expériences antérieures. La technique des dosages a aussi été la même, à cela près que nous avons opéré sur les foies seuls et non sur les animaux entiers. Comme les foies de rats sont très petits, surtout dans les premières semaines, nous avons dû réunir ceux de plusieurs portées, jusqu'à 33, prove-

(1) Gab. BERTRAND et M^{lle} Y. BEAUZEMONT. *C. R. Ac. Sc.*, **190**, 1930, p. 1089, ou ces *Annales*, **45**, 1930, p. 247.

(2) Gab. BERTRAND et R. VLADESCO. *C. R. Ac. Sc.*, **172**, 1921, p. 768 et **173**, 1921, p. 54, ou *Bull. Soc. chim.*, 4^e série, **29**, 1921, p. 736 et **31**, 1922, p. 268.

(3) *Loc. cit.*

(4) On admet ordinairement que les souris et les rats sont sevrés par leurs mères respectives le vingt et unième jour. Les ratons commencent cependant à grignoter les substances alimentaires à leur portée déjà quelques jours avant.

nant de six portées, pour les rats examinés le jour de la naissance. Nous mettions alors de côté les foies recueillis, pesés et séchés, au fur et à mesure, jusqu'au moment où nous en avions un poids suffisant pour effectuer un dosage dans de bonnes conditions. Voici les résultats de nos nouvelles expériences :

	AGE DES ANIMAUX EXAMINÉS			
	1 jour	15 jours	30 jours	7 mois
Nombre de foies analysés	33	19	12	4
Poids des foies frais analysés, en grammes	6,99	12,18	23,06	29,24
Poids d'un foie frais, en grammes . .	0,21	0,64	1,92	7,31
Eau pour cent	78,70	75,25	79,97	76,07
Zinc pour cent de foie frais, en milligrammes	24,35	12,70	7,38	7,76
Zinc pour cent de foie sec, en milligrammes	114,31	51,31	36,84	32,42
Zinc total d'un foie, en milligramme.	0,031	0,085	0,141	0,570

Ces résultats mettent en évidence une variation de la teneur en zinc du foie qui ressemble beaucoup à celle qui a été reconnue chez l'animal entier : dans le premier cas comme dans le second, il y a environ trois fois et demie plus de métal au moment de la naissance qu'à l'âge adulte.

Il apparaît cependant une différence. Dans le foie, la proportion de zinc diminue progressivement, mais elle ne tombe pas, à la fin de la période d'alimentation lactée, à un taux inférieur à celui que l'on rencontre plus tard. Cette différence tient sans doute à ce que le rôle du foie devient relativement plus grand chez l'adulte qu'il n'est chez le nouveau-né. Du moins constate-t-on que son poids s'élève plus rapidement que celui du corps : de la naissance au septième mois, il a augmenté dans le rapport de 1 à 35, tandis que le poids du corps n'a augmenté que dans le rapport de 1 à 21.

Il est intéressant de rapprocher ces faits de ceux qui ont été découverts au cours des recherches classiques de Bunge et de ses disciples sur le fer. Un tel rapprochement fait ressortir, en effet, une très grande analogie entre la manière dont les deux métaux pénètrent, se répartissent et se mobilisent dans le corps des jeunes mammifères.

LES VACCINATIONS ANTIRABIKUES

A L'INSTITUT PASTEUR EN 1930

par JULES VIALA.

Pendant l'année 1930, 589 personnes ont subi le traitement antirabique à l'Institut Pasteur de Paris : aucune mort n'a été signalée.

La statistique s'établit donc ainsi :

Personnes traitées	589
Mort	0
Mortalité p. 100.	0

Le tableau ci-dessous indique les résultats généraux des vaccinations depuis l'origine :

ANNÉE	PERSONNES traitées	MORTS	MORTALITÉ p. 100	ANNÉE	PERSONNES traitées	MORTS	MORTALITÉ p. 100
1886	2.671	25	0,94	1909	467	1	0,21
1887	2.770	14	0,79	1910	401	0	0,00
1888	1.622	9	0,55	1911	341	1	0,29
1889	1.830	7	0,38	1912	395	0	0,00
1890	1.540	5	0,32	1913	330	0	0,00
1891	1.559	4	0,25	1914	373	0	0,00
1892	1.790	4	0,22	1915	654	1	0,15
1893	1.648	6	0,36	1916	1.388	3	0,21
1894	1.387	7	0,50	1917	1.543	4	0,26
1895	1.520	5	0,38	1918	1.803	3	0,16
1896	1.308	4	0,30	1919	1.813	3	0,16
1897	1.529	6	0,39	1920	1.126	6	0,53
1898	1.465	3	0,20	1921	998	1	0,10
1899	1.614	4	0,25	1922	754	0	0,00
1900	1.420	4	0,28	1923	727	0	0,00
1901	1.321	5	0,38	1924	764	1	0,14
1902	1.005	2	0,18	1925	782	0	0,00
1903	628	2	0,32	1926	634	0	0,00
1904	755	3	0,39	1927	639	0	0,00
1905	721	3	0,41	1928	671	0	0,00
1906	772	1	0,13	1929	542	0	0,00
1907	786	3	0,38	1930	589	0	0,00
1908	524	1	0,19				

Les personnes traitées à l'Institut Pasteur sont divisées en trois catégories :

Catégorie A. — La rage de l'animal mordeur a été expérimentalement constatée par le développement de la maladie chez des animaux mordus par lui ou inoculés avec son bulbe.

Catégorie B. — La rage de l'animal mordeur a été constatée par examen vétérinaire.

Catégorie C. — L'animal mordeur est suspect de rage.

Nous donnons ci-après la répartition entre ces catégories des personnes traitées en 1930 :

ANNÉE 1930	MORSURES à la tête			MORSURES aux mains			MORSURES aux membres			TOTAUX		
	Traités	Morts	Mortalité p. 100	Traités	Morts	Mortalité p. 100	Traités	Morts	Mortalité p. 100	Traités	Morts	Mortalité p. 100
Catégorie A. .	4	0	0	48	0	0	25	0	0	77	0	0
Catégorie B. .	6	0	0	60	0	0	50	0	0	116	0	0
Catégorie C. .	12	0	0	169	0	0	215	0	0	396	0	0
	22	0	0	277	0	0	290	0	0	589	0	0

Les personnes se répartissent de la façon suivante, d'après le territoire sur lequel elles ont été mordues :

France.	586
Allemagne.	1
Belgique.	2

Répartition par départements des 586 personnes traitées mordues en France.

Aisne.	4	Aube.	3
Algérie.	3	Aveyron.	1
Allier.	4	Calvados.	8
Alpes-Maritimes.	5	Cantal.	2
Ardennes.	5	Cher.	7

Colonies françaises.	1	Oise	5
Corrèze.	4	Orne	5
Côte-d'Or.	2	Pas-de-Calais	1
Côtes-du-Nord.	5	Puy-de-Dôme.	8
Creuse	5	Pyrénées (Basses-).	1
Eure	8	Pyrénées (Hautes-).	7
Eure-et-Loir	13	Rhin (Bas-).	1
Finistère	6	Rhin (Haut-).	1
Garonne (Haute-).	1	Saône (Haute-).	1
Ille-et-Vilaine.	12	Saône-et-Loire	2
Indre	8	Sarthe	4
Indre-et-Loire.	8	Seine.	232
Loir-et-Cher	3	Seine-et-Marne	8
Loire-Inférieure.	16	Seine-et-Oise.	76
Loiret	8	Seine Inférieure	26
Lot	8	Sèvres (Deux-).	6
Lot-et-Garonne.	1	Somme	4
Maine-et-Loire	4	Tarn-et-Garonne	1
Manche	5	Tunisie.	1
Marne	2	Var.	1
Marne (Haute-).	1	Vaucluse.	4
Maroc.	1	Vendée	4
Mayenne	6	Vienne	5
Meurthe-et-Moselle.	1	Vienne (Haute-).	5
Morbihan.	1	Vosges	2
Nièvre	1	Yonne	2

Depuis 1911, l'Institut Pasteur a adopté la méthode de conservation en glycérine des moelles atténuées, introduite dans la pratique par A. Calmette.

On se sert de pots-bans d'une contenance de 50 cent. cubes.

Dans chacun, on verse 25 cent. cubes de glycérine neutre à 30° B^e.

On stérilise à 120°, pendant vingt minutes.

On laisse refroidir et on introduit dans chaque pot-ban quelques fragments de moelles préalablement desséchées dans un flacon de potasse, d'après la méthode initiale de Pasteur.

Dans chaque flacon contenant la glycérine on met plusieurs fragments de moelle dont la longueur totale peut atteindre 5 centimètres.

On conserve ces flacons à la glacière aux environs de + 4°.

Pour éviter l'infection de la moelle chez les lapins paralysés et agonisants, on place ces derniers dans une enceinte maintenue à 0°.

Sitôt qu'ils sont morts, on extrait la moelle par la méthode d'Oshida, au moyen d'un mandrin métallique nickelé stérile.

On n'utilise, pour la vaccination des personnes mordues, que des moelles ayant séjourné moins de vingt jours en glycérine, l'expérience ayant montré que le degré d'atténuation de chaque moelle n'est pas sensiblement modifié pendant les vingt premiers jours. Chaque sujet en traitement reçoit environ, journellement, 2 à 3 millimètres de moelle triturée dans 3 centimètres cubes d'eau distillée stérilisée.

Le virus fixe de passage actuellement utilisé est le même que celui dont on s'est toujours servi depuis la création du service de vaccinations antirabiques, d'abord rue d'Ulm, et ensuite (à partir de 1888) à l'Institut Pasteur.

Il convient de signaler que, depuis le *19 août 1911*, les inoculations de passage du virus fixe sont toujours effectuées, non plus avec le bulbe frais de lapin rabique, mais avec le bulbe conservé depuis au moins quarante-huit heures en glycérine à la glacière.

Depuis que cette technique a été adoptée, nous n'avons jamais constaté de modifications dans les délais d'incubation de la maladie après inoculation sous la dure-mère.

Nous reproduisons ci-après le schéma des traitements suivis par les mordus, suivant la gravité de leurs morsures.

Injections antirabiques.

1 ^{er} jour	Moelle de 5 jours	} 3 cent. cubes Morsures légères.
2 ^e —	— 5 —	
3 ^e —	— 4 —	
4 ^e —	— 4 —	
5 ^e —	— 3 —	
6 ^e —	— 3 —	
7 ^e —	— 4 —	
8 ^e —	— 3 —	
9 ^e —	— 2 —	
10 ^e —	— 4 —	
11 ^e —	— 3 —	
12 ^e —	— 2 —	
13 ^e —	— 3 —	
14 ^e —	— 3 —	
15 ^e —	— 2 —	
16 ^e jour	Moelle de 4 jours	} 3 cent. cubes Morsures multiples.
17 ^e —	— 3 —	
18 ^e —	— 2 —	

19 ^e	jour	Moelle de 3 jours	} 3 cent. cubes <i>Morsures</i> <i>graves.</i>
20 ^e	—	— 3 —	
21 ^e	—	— 2 —	
22 ^e	jour	Moelle de 3 jours	} 3 cent. cubes <i>Morsures</i> <i>à la tête.</i>
23 ^e	—	— 3 —	
24 ^e	—	— 2 —	
25 ^e	—	— 2 —	

Le Gérant : G. MASSON.